



REC'D 04 MAR 2005

INPI PCT

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 20 DEC. 2004

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr



INSTITUT NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE
26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

N° 11354*03
REQUÊTE EN DÉLIVRANCE
page 1/2

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 e W / 210502

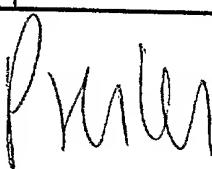
REMISE DES PIÈGES RÉSERVÉ À L'INPI 18 DEC 2003 DATE LIEU 75 INPI PARIS B N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI Vos références pour ce dossier <i>(facultatif)</i>		1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE CABINET ORES 36, rue de Saint-Pétersbourg 75008 PARIS
Confirmation d'un dépôt par télécopie 2 NATURE DE LA DEMANDE <input checked="" type="checkbox"/> Demande de brevet <input type="checkbox"/> Demande de certificat d'utilité <input type="checkbox"/> Demande divisionnaire <i>Demande de brevet initiale</i> <input type="checkbox"/> <i>ou demande de certificat d'utilité initiale</i> <input type="checkbox"/> Transformation d'une demande de brevet européen <i>Demande de brevet initiale</i> <input type="checkbox"/> <i>N°</i> <input type="text"/> Date <input type="text"/>		<input type="checkbox"/> <i>N° attribué par l'INPI à la télécopie</i> Cochez l'une des 4 cases suivantes <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <i>N°</i> <input type="text"/> Date <input type="text"/> <input type="checkbox"/> <i>N°</i> <input type="text"/> Date <input type="text"/> <input type="checkbox"/> <i>N°</i> <input type="text"/> Date <input type="text"/>
3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) UTILISATION DE MIMÉTIQUES DE LA SUPEROXYDE DISMUTASE ET DE LA GLUTATHION REDUCTASE COMME ANTI-CANCEREUX.		
4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		<input type="checkbox"/> <i>Pays ou organisation</i> <input type="checkbox"/> <i>Date</i> <input type="text"/> <i>N°</i> <input type="checkbox"/> <i>Pays ou organisation</i> <input type="checkbox"/> <i>Date</i> <input type="text"/> <i>N°</i> <input type="checkbox"/> <i>Pays ou organisation</i> <input type="checkbox"/> <i>Date</i> <input type="text"/> <i>N°</i> <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé « Suite »
5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases) <input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique		
Nom ou dénomination sociale Prénoms Forme juridique N° SIREN Code APE-NAF		UNIVERSITE RENE DESCARTES (PARIS V)
Domicile ou siège Rue Code postal et ville Pays		12, rue de l'Ecole de Médecine 75006 PARIS FRANCE
Nationalité N° de téléphone (facultatif) Adresse électronique (facultatif)		<i>N° de télécopie (facultatif)</i>
<input checked="" type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé « Suite »		

Remplir impérativement la 2^{me} page

**BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ**
**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE
page 2/2**

BR2

REMISE DES PIÈCES	Réervé à l'INPI
DATE	18 DEC 2003
LIEU	75 INPI PARIS B
N° D'ENREGISTREMENT	0314933
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI	

6 MANDATAIRE (s'il y a lieu)		DB 540 W / 210502
Nom Prénom Cabinet ou Société		VIALLE-PRESLES Marie Jose CABINET ORES
N °de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel		
Adresse	Rue	36, rue de Saint-Pétersbourg
	Code postal et ville	[7 5 10 10 18] PARIS
	Pays	FRANCE
N ° de téléphone (facultatif)		01.53.21.11.00
N ° de télécopie (facultatif)		01.53.21.08.88
Adresse électronique (facultatif)		ores@cabinet-ores.com
7 INVENTEUR (S)		
Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		
<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)		
8 RAPPORT DE RECHERCHE		
<input checked="" type="checkbox"/> Etablissement immédiat ou établissement différé		
<input checked="" type="checkbox"/> Paiement échelonné de la redevance (en deux versements)		
<input type="checkbox"/> Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt		
<input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non		
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		
<input type="checkbox"/> Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requise pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenu antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence). AG <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		
<input type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences		
<input type="checkbox"/> Le support électronique de données est joint <input type="checkbox"/> La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe		
<input type="checkbox"/> Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes 1		
11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		
		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI
		



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354*03

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Page suite N° 1.../1...



Réservé à l'INPI

REMISE DES PIÈCES
DATE 18 DEC 2003

LIEU 75 INPI PARIS B

0314933

N° D'ENREGISTREMENT

NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 829 © W / 010702

4 Vos références pour ce dossier (facultatif)		MJPbv1405/4	
4.1 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation Date <input type="text"/> N°	
		Pays ou organisation Date <input type="text"/> N°	
		Pays ou organisation Date <input type="text"/> N°	
5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)		<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique	
Nom ou dénomination sociale		PROTEXEL	
Prénoms			
Forme juridique		Société à responsabilité limitée	
N° SIREN		<input type="text"/>	
Code APE-NAF		<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	
Domicile ou siège	Rue	Faculté de Médecine Cochin Port-Royal 24, rue du Faubourg Saint-Jacques	
	Code postal et ville	17 510 114 PARIS	
	Pays	FRANCE	
Nationalité			
N° de téléphone (facultatif)			
N° de télécopie (facultatif)			
Adresse électronique (facultatif)			
5.1 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)		<input type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique	
Nom ou dénomination sociale			
Prénoms			
Forme juridique			
N° SIREN		<input type="text"/>	
Code APE-NAF		<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	
Domicile ou siège	Rue		
	Code postal et ville	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	
	Pays		
Nationalité			
N° de téléphone (facultatif)			
N° de télécopie (facultatif)			
Adresse électronique (facultatif)			
6 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		VIALLE-PRESLES Marie José (n° 93-2009)	
		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI	

La présente invention est relative à l'utilisation de mimétiques chimiques de la superoxyde dismutase (SOD) pour inhiber la croissance tumorale, et potentialiser les effets de traitements antitumoraux sur les 5 cellules tumorales tout en inhibant leurs effets toxiques sur les cellules normales.

Le terme : « formes réactives de l'oxygène » (FRO) englobe un ensemble de dérivés réduits de l'oxygène, comme l'anion superoxyde ($O_2^{-\cdot}$), le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), ou le radical hydroxyl (OH[·]). Ces dérivés sont 10 normalement générés par le métabolisme cellulaire, en particulier dans les mitochondries, lors de la réduction de l'oxygène moléculaire en H₂O. Ils sont en outre produits en 15 quantités importantes dans certaines conditions, par exemple lors de l'exposition aux rayonnements ionisants ou aux rayons ultraviolets, ou de l'exposition à certains produits chimiques.

Les formes réactives de l'oxygène étant très toxiques, les cellules disposent de différents moyens de les 20 neutraliser. Parmi ces moyens de détoxification figurent en particulier des enzymes « anti-oxydantes » parmi lesquelles on citera les superoxyde dismutases (SOD ; EC 1.15.1.1) qui catalysent la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène + O₂, et les enzymes intervenant ensuite dans la 25 détoxification du peroxyde d'hydrogène, telles que la catalase (EC 1.11.1.6) qui catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène (2 H₂O₂ → O₂ + 2 H₂O), la glutathion-peroxydase (EC 1.11.1.9) qui catalyse la réduction du peroxyde d'hydrogène par le glutathion réduit (GSH), en 30 produisant du glutathion oxydé (GSSG) et de l'eau (2 GSH + H₂O₂ → GSSG + 2 H₂O), et la glutathion-réductase (EC 1.8.1.7), qui régénère le GSH selon la réaction GSSG + NADPH + H⁺ → 2 GSH + NADP⁺.

35 Lorsque la production de formes réactives de l'oxygène excède les capacités de détoxification de la cellule, les effets toxiques de ces dérivés se manifestent, et peuvent induire des dommages importants au niveau de constituants cellulaires tels que les protéines, les lipides

membranaires, ou l'ADN. Le stress oxydant ainsi généré joue un rôle majeur dans l'apparition et le développement de diverses maladies, notamment des pathologies inflammatoires et auto-immunes, et des cancers.

5 Il est à l'heure actuelle généralement admis que les formes réactives de l'oxygène interviennent dans la pathogenèse de nombreux cancers. Toutefois, il apparaît que leurs effets mettent en jeu des mécanismes complexes, qui sont loin d'être élucidés.

10 En quantités sub-létales, les FRO peuvent favoriser l'apparition de cancers, par exemple en provoquant des mutations au niveau des régions codantes ou des régions régulatrices, ou en inhibant, ou au contraire en stimulant l'expression de gènes impliqués dans la régulation de la 15 prolifération ou de la différenciation cellulaires, ou de l'apoptose. Il a ainsi été proposé d'utiliser des antioxydants dans le cadre de traitements curatifs ou préventifs de différents cancers. Par exemple, une alimentation supplémentée en antioxydants, notamment en 20 vitamine E, a été préconisée dans le but de prévenir le cancer.

A fortes concentrations, les FRO peuvent induire directement la mort cellulaire, notamment en provoquant des réactions de peroxydation lipidique et protéique, qui peuvent 25 favoriser la dépolarisation mitochondriale et ainsi accélérer les phases effectrices de l'apoptose. Cette activation de l'apoptose par les FRO peut constituer un moyen de détruire les cellules tumorales.

Par exemple, les traitements par radiothérapie 30 reposent essentiellement sur l'induction d'une surproduction de FRO dans les cellules tumorales. De même, de nombreuses molécules utilisées dans la chimiothérapie des cancers induisent dans les cellules une surproduction de FRO, qui serait responsable, au moins en partie, de l'effet anti-tumoral de ces molécules.

Parmi les molécules anticancéreuses connues pour induire une production de FRO, on citera notamment la doxorubicine, la mitomycine C, l'étoposide, le cisplatine

(YOKOMIZO et al., Cancer Res, 55: 4293-4296 1995), le tamoxifène (FERLINI et al., Br J Cancer, 79, 257-263, 1999) le taxol, et le 5-fluoro-uracile.

5 Toutefois, l'une des principales limitations à l'utilisation de ces molécules découle du fait que la production de FRO qu'elles induisent peut aussi entraîner la mort de cellules normales et conduire à des lésions irréversibles aux conséquences très préjudiciables. C'est le cas, par exemple, de la destruction des globules blancs 10 (leucopénie), observée au cours de nombreuses chimiothérapies et qui expose les patients à un risque infectieux accru.

15 Les Inventeurs ont entrepris de tester les effets de différentes molécules, connues pour leur capacité de neutraliser à différents niveaux la production de FRO, sur la prolifération de différentes lignées de cellules tumorales, ainsi que sur la viabilité de ces cellules tumorales et celle 20 de leucocytes humains normaux ; ils ont ensuite testé, de la même manière, les effets de ces molécules sur les propriétés cytostatiques et cytotoxiques d'agents de chimiothérapie antitumorale connus pour induire la production de FRO.

Les molécules antioxydantes qui ont été testées sont les suivantes :

25 - la N-acétyl cystéine (NAC), qui est un antioxydant, capteur de radicaux libres, et précurseur du glutathion intracellulaire ;

- le CuDIPS (Cu[II]-[diisopropylsalicylate]) qui est un mimétique chimique de la CuZn SOD (MC KENZIE et al., Br. J. Pharmacol. 127, 1159-1164, 1999) ;

30 - le MnTBAP (Mn(III) tetrakis (5,10,15,20-benzoic acid) porphyrine), qui est un mimétique chimique de la MnSOD (PASTERNACK et al., Inorg. Biochem., 15, 261-267 1981) ainsi que de la catalase et de la glutathion peroxydase (Demande PCT/WO 01/12327) ;

35 - le MnDPDP (manganèse dipyridoxyl phosphate (Mn-DPDP), également dénommé Mangafodipir (DCI), qui est un mimétique chimique de la MnSOD ainsi que de la catalase et de la glutathion réductase (Demande PCT/WO 02/087579).

Les Inventeurs ont observé que le traitement par la NAC induit une augmentation de la prolifération des cellules tumorales, alors que le traitement par le MnTBAP, le CuDIPS, ou le MnDPDP induit une réduction de cette prolifération. En ce qui concerne la viabilité cellulaire, la NAC n'a aucun effet sur celle-ci, qu'il s'agisse des cellules tumorales ou des leucocytes humains normaux. Le MnTBAP ou le CuDIPS diminuent la viabilité des cellules tumorales et également, bien que dans une moindre mesure, celle des leucocytes humains normaux. En revanche, le MnDPDP diminue la viabilité des cellules tumorales, mais, de manière surprenante, n'influence pas celle des leucocytes humains normaux.

Dans le cas de l'association de ces molécules antioxydantes avec des agents antitumoraux, les Inventeurs ont observé que la NAC inhibe les effets cytostatiques et cytotoxiques de ces agents sur les cellules tumorales, alors que le MnTBAP, le CuDIPS, et le MnDPDP les augmentent.

Les effets de la NAC, du MnTBAP, et du CuDIPS sur la cytotoxicité des agents antitumoraux vis-à-vis des leucocytes normaux sont similaires à ceux observés sur les cellules tumorales ; en revanche le MnDPDP diminue la cytotoxicité des agents antitumoraux sur les leucocytes humains normaux, à l'inverse de l'effet observé dans le cas des cellules tumorales.

Il apparaît donc que le MnDPDP est capable d'induire ou de potentialiser un stress oxydant chimio-induit au niveau des cellules tumorales, tout en préservant la viabilité des cellules normales.

Les Inventeurs ont également testé les effets de la NAC, du MnTBAP, du CuDIPS et du MnDPDP, administrés isolément ou associés à un agent de chimiothérapie antitumorale, sur le développement de tumeurs *in vivo* chez la souris.

Ils ont observé que l'administration de NAC induisait une augmentation du volume tumoral, alors que l'administration de MnTBAP, de CuDIPS ou de MnDPDP diminue le volume des tumeurs. En association avec un agent antitumoral,

la NAC bloque l'effet inhibiteur de cet agent sur la croissance tumorale, alors que le MnTBAP, le CuDIPS ou le MnDPDP augmentent cet effet inhibiteur.

5 Ces propriétés singulières du mangafodipir, par rapport à celles d'autres anti-oxydants, et en particuliers des autres mimétiques de SOD testés, apparaissent liées à sa double activité de mimétique de la superoxyde dismutase et de la glutathion réductase.

10 La présente invention a pour objet l'utilisation d'un mimétique de superoxyde dismutase et de glutathion réductase pour l'obtention d'un médicament anti-cancéreux.

15 Des mimétiques de SOD possédant aussi une activité de mimétique de glutathion réductase utilisables conformément à l'invention sont notamment des dérivés de dipyridoxal phosphate, tels que ceux décrits dans le Brevet EP 0936615, sous forme de leurs chélates d'un cation divalent, tel que le cuivre, le zinc, ou avantageusement le manganèse.

20 De manière plus générale on peut utiliser toute molécule qui possède une activité de mimétique de SOD, et qui est également capable de mimer la glutathion réductase en réduisant le glutathion oxydé, ou bien d'agir comme cofacteur de la glutathion réductase: dans ce cadre, on citera par exemple les chélates d'un cation divalent comme le manganèse, le cuivre ou le zinc (KELLY GS., Altern Med Rev, 3, 114-27, 25 1998) avec un donneur de thiols comme la N-acétyl-cystéine (SKRZYDLEWSKA et al., Drug Alcohol Depend. 57, 61-7, 1999) ou avec une vitamine (GRIMBLE RF., Int J Vitam Nutr Res. 67, 312-20, 1997) comme les vitamines B1 et B6, les tocophérols 30 ou l'acide ascorbique, ou des dérivés de ces molécules capables de chélater un cation divalent.

Selon un mode de réalisation préféré de la présente invention, ledit mimétique de superoxyde dismutase et de glutathion réductase est le Mangafodipir (MnDPDP).

35 Selon un mode de mise en œuvre préféré de la présente invention, le Mangafodipir est utilisé en association avec un autre agent anti-tumoral, de préférence un agent antitumoral capable d'induire dans les cellules une production de FRO.

A titre d'exemples d'agents anti-tumoraux capables d'induire dans les cellules une production de FRO, utilisables dans le cadre de la présente invention, on citera notamment, outre les agents anti-tumoraux mentionnés ci-dessus (doxorubicine, mitomycine C, étoposide, dérivés de platine, tamoxifène, taxol, 5-fluoro-uracile), les molécules suivantes: irinotécan, gemcitabine, endoxan, streptozotocine, bléomycine, vincristine).

La présente invention a également pour objet une composition pharmaceutique comprenant du Mangafodipir associé avec un autre agent anti-tumoral, tel que défini ci-dessus.

Pour la mise en œuvre de la présente invention, le Mangafodipir sera généralement employé dans des formulations permettant l'administration d'une dose de principe actif comprise entre 1 et 100 mg/kg/jour. Des doses plus élevées peuvent toutefois être utilisées, compte tenu de la faible toxicité de ce produit. Il est bien entendu que l'homme de l'art peut adapter ces doses en fonction des particularités de chaque patient et de la pathologie concernée.

Ces formulations peuvent être administrées par différentes voies, par exemple par voie orale, ou par injections, en particulier par injections sous-cutanées, intra-musculaires ou intra-veineuses. D'autres voies d'administration pourront être envisagées si elles augmentent l'efficacité, la biodisponibilité ou la tolérance des produits. La voie la plus appropriée peut être choisie par l'homme du métier en fonction de la formulation utilisée.

La présente invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples non-limitatifs montrant les propriétés antitumorales du Mangafodipir et ses effets cytoprotecteurs sur des cellules non-tumorales.

EXEMPLE 1 : INFLUENCE DE DIVERSES MOLECULES ANTIOXYDANTES SUR LES PROPRIETES PROLIFERATIVES BASALES DES CELLULES TUMORALES.

Des tests de prolifération cellulaire *in vitro*, ont été réalisés sur les lignées cellulaires suivantes : CT26

(mouse colon carcinoma, ATCC (American Type Culture Collection) n°2638), Hepa 1-6 (mouse liver hepatoma, ATCC n°1830), A 549 (Human lung carcinoma, ATCC n°185) Ces lignées ont été préalablement cultivées, dans un incubateur humide à 5 37°C sous 5% de CO₂, en milieu Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/Glutamax-I contenant 10% de sérum de veau fœtal et des antibiotiques [penicilline (100U/ml)/streptomycine (100µg/ml)] (LIFE TECHNOLOGIES, Cergy Pontoise, France). Toutes ces lignées cellulaires ont été testées régulièrement 10 pour exclure toute infection à mycoplasmes.

Pour le test de prolifération, les cellules (2 x 10⁴ cellules/puits) ont été ensemencées dans des plaques 96 puits (COSTAR, Corning, Inc. NY, USA) et incubées 48 heures en milieu complet additionné de concentrations croissantes, 15 de 0 à 400µM, de N-Acetyl-Cystéine (NAC, SIGMA, Saint-Quentin Fallavier, France), de MnTBAP (mimétique de la MnSOD ; CALBIOCHEM, Paris, France), de CuDIPS (mimétique de la Cu/Zn SOD ; SIGMA, Saint-Quentin Fallavier, France) ou de Mangafodipir (MnDPDP ou TELASCAN, AMERSHAM HEALTH, Amersham, 20 UK).

La prolifération cellulaire est déterminée en incubant les cellules pendant 16 heures avec de la [³H]-thymidine (1µCi/puits).

Les résultats de ces expériences, sur différentes 25 lignées tumorales, pour la NAC, le MnTBAP, le CuDIPS et le MnDPDP sont illustrés dans les figures 1, 2, 3 et 4 respectivement.

Légende des figures 1, 2, 3, et 4 :

En abscisse : concentration en anti-oxydant (en 30 µM),

En ordonnée : radioactivité de la [³H] thymidine en cpm.

On observe une augmentation de la prolifération des cellules tumorales en réponse au traitement par la NAC 35 (figure 1). Cette augmentation de la prolifération est de 73% pour les cellules Hepa 1-6, en présence de 100µM de NAC et de 45 et 47% en présence de 400µM de NAC pour les cellules tumorales A 549 et CT26 respectivement.

Au contraire, le traitement des cellules tumorales Hepa 1-6, CT26 et A 549 avec le MnTBAP (figure 2), le CuDIPS (figure 3) ou le MnDPDP (TESLASCAN, figure 4) réduit de manière dose dépendante leur prolifération. Cette 5 réduction de la prolifération cellulaire atteint près de 90% en présence de 400 μ M d'une de ces trois molécules.

EXEMPLE 2 : EFFETS DE LA NAC, DU CuDIPS, DU MnTBAP ET DU MnDPDP SUR LA VIABILITE DE LIGNEES TUMORALES OU DE LEUCOCYTES HUMAINS NORMAUX.

10 Des tests de viabilité *in vitro*, en réponse au traitement avec la NAC, le CuDIPS, le MnTBAP ou le MnDPDP, ont été réalisés sur les lignées cellulaires de l'exemple 1 ainsi que sur des leucocytes humains normaux. Ces derniers ont été obtenus chez des volontaires sains, après 15 consentement éclairé, par prélèvement de sang veineux recueilli sur anticoagulant (héparinate de lithium). Les globules rouges ont été lysés par choc osmotique à l'aide d'une solution hypotonique d'acétate de potassium et les leucocytes ont été cultivés dans les conditions décrites à 20 l'exemple 1.

Pour les tests de viabilité, les cellules (2×10^4 cellules/puits) ont été ensemencées dans des plaques 96 puits (COSTAR, Corning, Inc. NY, USA) et incubées 48 heures en milieu complet additionné de concentrations croissantes, de 0 25 à 400 μ M, de NAC, de MnTBAP, de CuDIPS ou de MnDPDP. La viabilité cellulaire a été évaluée par réduction d'un sel de méthylthiazol-tétrazolium (MTT ; SIGMA) en formazan. Les cellules ont été exposées à 20 μ l de MTT (5 mg/ml en PBS) et incubées 4 h à 37°C. Puis, 150 μ l de milieu ont été retirés de 30 chaque puits et la réaction est révélée par l'addition de 100 μ l de DMSO (SIGMA). L'absorbance est analysée pour chaque puits à 550nm et à 630nm avec un lecteur de plaque ELISA. Le nombre de cellules viables est déterminé, par la différence entre l'absorbance à 550 nm et l'absorbance à 630 nm.

35 Les résultats de ces expériences pour les lignées tumorales CT26, Hepa 16 et A549, ainsi que pour les leucocytes normaux sont illustrés dans les figures 5, 6, 7 et

8, pour la NAC, le MnTBAP, le CuDIPS et le MnDPDP respectivement.

Légende des figures 5 à 8 :

En abscisse : concentration en anti-oxydant 5 (en μ M),

En ordonnée : DO à 550 nm - DO à 630 nm.

On observe que le traitement par la NAC des cellules tumorales Hepa 1-6, CT26 et A 549 ou des leucocytes humains normaux est sans effet sur la viabilité cellulaire 10 (figure 5).

Au contraire, le traitement des cellules tumorales Hepa 1-6, CT26 et A 549 avec le MnTBAP (figure 6) ou le CuDIPS (figure 7) diminue de manière dose dépendante la viabilité des cellules tumorales. La viabilité des cellules tumorales Hepa 1-6, CT26 et A 549 est réduite de 62%, 75% et 15 37%, respectivement, par 400 μ M MnTBAP, et de 74%, 85% et 50% respectivement, par 400 μ M de CuDIPS. Toutefois, le traitement des leucocytes humains normaux avec le MnTBAP et le CuDIPS induit également une diminution de la viabilité cellulaire, 20 laquelle atteint au maximum 18% et 50% respectivement.

Enfin, si le MnDPDP (Mangafodipir ou TESLASCAN, figure 8) réduit également de manière dose dépendante la viabilité des cellules tumorales Hepa 1-6, CT26 et A 549, il 25 n'influence pas la viabilité des leucocytes humains normaux, et ceci quelle que soit la dose de mangafodipir utilisée.

EXEMPLE 3 : EFFETS DE LA NAC, DU CuDIPS, DU MnTBAP ET DU MnDPDP SUR LES PROPRIETES ANTI-PROLIFERATIVES ET CYTOTOXIQUES DE MOLECULES UTILISEES DANS LA CHIMIOTHERAPIE DES CANCERS.

Les molécules antitumorales suivantes : 30 oxaliplatin (appartenant à la famille du cisplatin) ; taxol ; 5-fluoro-uracile ; qui sont connues pour induire la production de FRO dans les cellules tumorales, ont été utilisées. Pour chacune de ces molécules, des tests de prolifération et de viabilité cellulaire ont été effectués, 35 en l'absence de molécules antioxydantes, ou en présence de concentrations croissantes de NAC, de MnTBAP, de CuDIPS ou de MnDPDP.

1) Effets sur les propriétés antiprolifératives :

Les tests de prolifération ont été effectués sur les lignées tumorales CT26, Hepa 16, et A549, selon le protocole décrit à l'exemple 1.

5 Oxaliplatin :

L'oxaliplatin (ELOXATINE ou [(1R,2R)-1,2-cyclohexanediamine-N,N'] [oxalato (2-)-O,O'] platine (II) ; SANOFI-PHARMA, Paris, France) a été utilisé dans tous les tests à une concentration de 10 μ M.

10 Les résultats des tests de prolifération cellulaire des lignées tumorales CT26, Hepa 16 et A549 sont illustrés dans les figures 9, 10, 11 et 12, pour la NAC, le MnTBAP, le CuDIPS et le MnDPDP respectivement.

Légende des figures 9 à 12 :

15 En abscisse : présence (+) ou absence (-) d'oxaliplatin ; concentration en anti-oxydant (en μ M),

En ordonnée : radioactivité de la [3 H] thymidine en cpm.

20 Le traitement des lignées tumorales Hepa 1-6, CT26 et A549 avec 10 μ M d'oxaliplatin seul diminue la prolifération des cellules tumorales de 70%, 91% et 93% respectivement (figure 9 à 12).

25 La NAC réduit de manière dose dépendante l'effet cytostatique de l'oxaliplatin et ceci quel que soit le type de cellules tumorales (figure 9).

Au contraire, le MnTBAP (figure 10), le CuDIPS (figure 11) et le MnDPDP (figure 12) augmentent de manière dose-dépendante les propriétés anti-prolifératives de l'oxaliplatin.

30 Taxol :

Le taxol (PACLITAXEL ; BRISTOL-MYERS-SQUIBB, Paris, France) a été utilisé dans tous les tests à une concentration de 10 μ M.

35 Les résultats des tests de prolifération des lignées tumorales CT26, Hepa 16 et A549 sont illustrés dans les figures 13, 14, 15 et 16, pour la NAC, le MnTBAP, le CuDIPS et le MnDPDP respectivement.

Légende des figures 13 à 16 :

En abscisse : présence (+) ou absence (-) de taxol ; concentration en anti-oxydant (en μ M),

En ordonnée : radioactivité de la [3 H] thymidine en cpm.

L'incubation avec le taxol réduit respectivement la prolifération des cellules tumorales A549, CT26 ou Hepa 1-6 de 85%, 71% et 65%, (figure 13 à 16).

L'addition de NAC réduit de manière dose-dépendante l'effet cytostatique du taxol sur les cellules tumorales (figure 13).

Au contraire, l'addition des trois mimétiques de SOD [MnTBAP (figure 14), CuDIPS (figure 15) ou de MnDPDP (figure 16)] augmente l'effet cytostatique du taxol de manière dose-dépendante.

5-FluoroUracil (5-FU) :

Le 5-FluoroUracil (5-FU) (fluoro-5 tétrahydro-1,2,3,4 pyrimidinedione-2,5 ou fluoro-uracile ; ICN PHARMACEUTICAL FRANCE, Orsay, France) a été utilisé dans tous les tests à une concentration de 50 μ M.

Les résultats des tests de prolifération des lignées tumorales CT26, Hepa 16 et A549 sont illustrés dans les figures 17, 18, 19 et 20, pour la NAC, le MnTBAP, le CuDIPS et le MnDPDP respectivement.

Légende des figures 17 à 20 :

En abscisse : présence (+) ou absence (-) de 5-FU ; concentration en anti-oxydant (en μ M),

En ordonnée : radioactivité de la [3 H] thymidine en cpm.

L'incubation des cellules tumorales avec le 5-FU réduit la prolifération des cellules tumorales Hepa 1-6, CT26 et A549 de 91%, 91% et 85%, respectivement (figure 17 à 20).

Comme pour l'oxaliplatine et le TAXOL, La NAC inhibe l'effet cytostatique du 5-FU sur les cellules tumorales (figure 17) alors que les trois mimétiques de SOD [MnTBAP (figure 18), CuDIPS (figure 19) et MnDPDP (TESLASCAN, figure 20)] l'augmentent.

2) Effets sur la viabilité cellulaire :

Les tests de viabilité ont été effectués sur les lignées tumorales CT26, Hepa 16, et A549, ainsi que sur des leucocytes humains normaux, selon le protocole décrit à 5 l'exemple 2.

Oxaliplatin :

L'oxaliplatin a été utilisé à une concentration de 10 μ M dans le cas des cellules tumorales, et à une concentration de 1 mM dans le cas des leucocytes normaux.

10 Les résultats sont illustrés par les figures 21, 22, 23 et 24, pour la NAC, le MnTBAP, le CuDIPS et le MnDPDP respectivement.

Légende des figures 21 à 24 :

En abscisse : présence (+) ou absence (-) 15 d'oxaliplatin ; concentration en anti-oxydant (en μ M),

En ordonnée : DO à 550 nm - DO à 630 nm.

Le traitement par l'oxaliplatin seul diminue en moyenne la viabilité des cellules tumorales Hepa 1-6, CT26 et A549 de 50%, 27% et 28% respectivement, et celle des 20 leucocytes normaux d'environ 50% (figures 21 à 24).

La NAC diminue de manière dose-dépendante les effets cytotoxiques de l'oxaliplatin sur tous les types de cellules tumorales, ainsi que sur les leucocytes normaux (figure 21).

25 Le MnTBAP (figure 22), le CuDIPS (figure 23) et le MnDPDP (figure 24) augmentent de manière dose-dépendante les propriétés cytotoxiques de l'oxaliplatin sur les cellules tumorales.

Sur les leucocytes normaux, le MnTBAP (figure 22) 30 et le CuDIPS (figure 23), augmentent également les propriétés cytotoxiques de l'oxaliplatin ; en revanche, le MnDPDP (figure 24) inhibe comme la NAC l'effet cytotoxique de l'oxaliplatin.

Taxol :

35 Le taxol a été utilisé à une concentration de 10 μ M dans le cas des cellules tumorales, et à une concentration de 20 μ M dans le cas des leucocytes normaux.

Les résultats sont illustrés par les Figures 25, 26, 27 et 28, pour la NAC, le MnTBAP, le CuDIPS et le MnDPDP respectivement.

Légende des figures 25 à 28 :

En abscisse : présence (+) ou absence (-) de taxol ; concentration en anti-oxydant (en μ M),

En ordonnée : DO à 550 nm - DO à 630 nm.

Le traitement par le taxol seul diminue, en moyenne, la viabilité des cellules tumorales Hepa 1-6, CT26 et A549 de respectivement 25%, 50% et 47% en moyenne, et celle des leucocytes normaux d'environ 50% (Figures 25 à 28).

L'addition de NAC n'influence pas l'activité cytotoxique du taxol sur les cellules tumorales, et la diminue sur les leucocytes normaux (Figure 25).

L'addition de MnTBAP (Figure 26), de CuDIPS (Figure 27) ou de MnDPDP (Figure 28)) augmente l'activité cytotoxique du taxol sur les cellules tumorales. Sur les leucocytes normaux, le MnTBAP n'a pratiquement pas d'influence sur l'effet cytotoxique du taxol (figure 26) et le CuDIPS (figure 27), augmente cet effet cytotoxique ; en revanche, le MnDPDP (figure 28) inhibe comme la NAC l'effet cytotoxique du taxol.

5-FluoroUracil (5-FU) :

Le 5-FU a été utilisé à une concentration de 50 μ M dans le cas des cellules tumorales, et à une concentration de 40 mM dans le cas des leucocytes normaux.

Les résultats sont illustrés par les Figures 29, 30, 31 et 32, pour la NAC, le MnTBAP, le CuDIPS et le MnDPDP respectivement.

Légende des figures 29 à 32 :

En abscisse : présence (+) ou absence (-) de 5-FU ; concentration en anti-oxydant (en μ M),

En ordonnée : DO à 550 nm - DO à 630 nm.

Le traitement par le 5-FU seul diminue, en moyenne, la viabilité des cellules tumorales Hepa 1-6, CT26 et A549 de respectivement 65%, 85% et 25%, et celle des leucocytes normaux d'environ 19% (figures 29 à 32).

L'addition de NAC ne modifie pas l'activité cytotoxique du 5-FU sur les cellules tumorales, et la diminue sur les leucocytes normaux (Figure 29).

L'addition de MnTBAP (figure 30), de CuDIPS 5 (figure 31) ou de MnDPDP (figure 32) augmente l'activité cytotoxique du 5-FU sur les cellules tumorales. Sur les leucocytes normaux, le MnTBAP n'a qu'une influence très faible sur l'effet cytotoxique du 5-FU (figure 30) ; le CuDIPS (figure 31) augmente cet effet cytotoxique ; en 10 revanche, le MnDPDP (figure 32) l'inhibe.

EXEMPLE 4 : MODULATION DES EFFETS DES FORMES OXYGENEES REACTIVES SUR L'ADN PAR LA NAC, LE CuDIPS, LE MnTBAP OU LE MnDPDP.

La molécule d'ADN est une des cibles principales 15 de l'effet anti-tumoral des dérivés du platine comme le cisplatine ou l'oxaliplatin. Les dérivés du platine réagissent sur l'ADN en modifiant sa structure tertiaire. Des métalloporphyrines cationiques sont des agents connus pour pouvoir interagir avec l'ADN.

20 Il a récemment été démontré que des métalloporphyrines ayant des propriétés mimant la SOD pouvaient potentialiser les effets délétères des FRO sur la structure de l'ADN.

Le plasmide pcDNA3.1 (INVITROGEN) purifié a été 25 utilisé pour analyser les altérations potentielles de l'ADN en réponse à l'addition de molécules utilisées dans la chimiothérapie des cancers en présence, ou en l'absence, de modulateurs d'enzymes antioxydantes. Cet ADN a ensuite été stocké à -20°C en 10mM TRIS, 1 mM EDTA jusqu'à son 30 utilisation.

L'ADN plasmidique a été incubé avec de l'oxaliplatin à un rapport molaire de 0,50 dans un volume final de 50µl. Le MnTBAP (5µM), le CuDIPS (5µM), le Mangafodipir (5µM) ou la NAC (5mM) ont alors été ajoutés à la 35 solution. La production d'anion superoxyde a été réalisée par addition de 200µM xanthine (SIGMA) et 1U de xanthine oxydase (SIGMA). L'incubation a été réalisée dans l'obscurité à 37°C

et pendant 24 h. A la fin de la période d'incubation, des aliquots de 10 μ l ont été soumis à une électrophorèse en gel d'agarose à 0.8% et détectés par coloration au bromure d'ethidium. Les gels ont ensuite été analysés par densitométrie (VILBER LOURMAT, Marnes-la-Vallée, France).

5 Les résultats sont illustrés dans la figure 33.

Légende de la Figure 33 :

10 A : Présence (+) ou absence (0) de plasmide ; concentration en oxaliplatine (en μ M) ; présence (+) ou absence (0) de xanthine et de xanthine oxydase (X/XO) ; présence (+) ou absence (0) de NAC.

15 B : Présence (+) ou absence (0) de plasmide ; concentration en oxaliplatine (en μ M) ; présence (+) ou absence (0) de xanthine et de xanthine oxydase (X/XO) ; présence (+) ou absence (0) d'anti-oxydant (Teslacan, MnTBAP, CuDIPS ou NAC).

20 L'incubation d'ADN plasmidique avec de la xanthine et de la xanthine oxydase (X/XO) génère des anions superoxydes qui altèrent la forme native super enroulée du DNA (ADN sous forme I) et favorise la forme circulaire (forme II DNA). Ce phénomène est inhibé par la neutralisation des FRO par la NAC.

25 L'incubation d'ADN plasmidique avec de l'oxaliplatine induit une altération dose dépendante de la structure de l'ADN maximale au rapport DNA/oxaliplatine de 0.5. Dans ces conditions, on n'observe plus de forme super enroulée et une bande correspondant à la forme III apparaît (forme linéaire). Le rapport forme I/forme II est encore plus abaissé si l'on co-incube l'ADN plasmique avec le système 30 X/XO et de faibles doses d'oxaliplatine. L'incubation avec la NAC diminue les dommages causés à l'ADN.

35 Dans un second temps, les effets des mimétiques de SOD sur les altérations de l'ADN induites par l'oxaliplatine seul ou associé aux FRO ont été évaluées. L'incubation de l'ADN plasmidique avec du Mangafodipir induit *per se* des dommages à l'ADN comme le montre l'augmentation de la proportion de forme II par rapport au plasmide non traité. Cet effet est amplifié lorsque l'on ajoute soit des anions

superoxydes, soit de l'oxaliplatine, et est maximal lorsque Mangafodipir, FRO et oxaliplatine sont co-incubés avec l'ADN plasmidique. Là encore, certains antioxydants comme la NAC inhibent partiellement les altérations de l'ADN.

5 Un effet similaire est observé lorsque le CuDIPS et, dans une moindre mesure, lorsque le MnTBAP est utilisé comme mimétique de SOD.

EXEMPLE 7 : EFFETS ANTI-TUMORAUX DE LA NAC, DU CuDIPS, DU MnTBAP ET DU MnDPDP ASSOCIES OU NON AVEC UNE CHIMIOTHERAPIE
10 ANTI-CANCEREUSE CHEZ LA SOURIS.

L'activité anti-tumorale *in vivo* de divers traitements antioxydants a été estimée. Pour ces expériences, des souris femelles BALB/c (pour l'injection de cellules tumorales CT-26) or C57/BL6 (pour l'injection de cellules tumorales Hepa 1-6) âgées de 6 à 8 semaines ont été utilisées 15 (IFFA CREDO, L'Arbresles, France). Deux millions de cellules tumorales ont été injectées dans le dos des animaux par voie sous-cutanée. Lorsque la taille de la tumeur a atteint 200 à 500 mm³, les animaux ont reçu une injection unique de 20 mg/kg d'oxaliplatine (ELOXATINE[®]) ou d'une solution saline.

Les souris ont ensuite été traitées par voie intrapéritonéale, deux heures après l'injection d'oxaliplatine ou de solution saline, avec 10 mg/kg de Mangafodipir, de MnTBAP ou de CuDIPS, ou avec 150 mg/kg de 25 NAC, ou avec une solution saline. L'injection des différents antioxydants a été poursuivie pendant un mois (trois injections par semaine aux mêmes doses). Un groupe de souris inoculées avec des cellules tumorales n'a pas été traité.

La taille des tumeurs a été mesurée tous les 30 trois jours. Le volume tumoral a été calculé comme suit: VT (mm³)=(LxW²)/2, où L est la plus longue et W la plus courte dimension de la tumeur en mm. Quinze souris ont été incluses dans chaque groupe.

Les résultats de l'expérience basée sur 35 l'injection de cellules tumorales de carcinome colique CT26 à des souris BALB/C sont illustrés dans la Figure 34.

Légende de la Figure 34 :

(♦) témoins,
(■) oxaliplatine,
(▲) teslacan,
(●) oxaliplatine + teslacan,
5 (○) NAC,
(✗) oxaliplatine + NAC,
(Δ) MnTBAP,
(□) oxaliplatine + MnTBAP,
(◊) CUDIPS,
10 (*) oxaliplatine + CUDIPS.

Le volume des tumeurs est indiqué en ordonnée ; en abscisse sont indiqués le nombre de jours suivant l'injection de l'oxaliplatine ou de solution saline.

On observe que l'injection de NAC à des souris 15 non traitées par l'oxaliplatine induit une augmentation de 44% des volumes tumoraux après un mois, par rapport aux souris ne recevant pas de NAC.

Alors que l'administration d'oxaliplatine divise 20 par deux les volumes tumoraux par rapport aux animaux non traités, l'administration de NAC à des souris traitées par oxaliplatine bloque totalement l'effet inhibiteur de l'oxaliplatine sur la croissance tumorale.

Au contraire, l'injection de mimétiques chimiques 25 de SOD comme le MnTBAP, le CuDIPS ou le Mangafodipir diminue respectivement de 59%, 28% et 54% le volume des tumeurs à un mois par rapport aux animaux non traités. En outre, les trois mimétiques de SOD administrés chez des souris traitées à l'oxaliplatine diminuent respectivement de 35%, 31% et 63% le volume des tumeurs à un mois par rapport aux animaux traités 30 seulement par l'oxaliplatine.

Les résultats de l'expérience basée sur l'injection de cellules Hepa 1-6 à des souris C57BL/6 sont illustrés dans la Figure 35.

Légende de la Figure 35 :

35 (♦) témoins,
(■) oxaliplatine,
(▲) teslacan,
(●) oxaliplatine + teslacan,

(O) NAC,
(X) oxaliplatine + NAC,
(Δ) MnTBAP,
(□) oxaliplatine + MnTBAP,
5 (◊) CuDIPS,
(*) oxaliplatine + CuDIPS.

Le volume des tumeurs est indiqué en ordonnée ; en abscisse sont indiqués le nombre de jours suivant l'injection de l'oxaliplatine ou de solution saline.

10 On observe là encore que l'injection de NAC induit une augmentation de 50% des volumes tumoraux après un mois, par rapport aux souris ne recevant pas de NAC. Alors que l'administration d'oxaliplatine divise par quatre les volumes tumoraux par rapport aux animaux non traités, 15 l'administration de NAC à des souris traitées par l'oxaliplatine bloque totalement l'effet inhibiteur de l'oxaliplatine sur la croissance tumorale. Au contraire, l'injection de mimétiques chimiques de SOD comme le MnTBAP, le CuDIPS ou le Mangafodipir diminue de 42%, 9% et 34% 20 respectivement, le volume des tumeurs à un mois par rapport aux animaux non traités. En outre, si la co-administration de MnTBAP et de CuDIPS avec de l'oxaliplatine n'augmente pas de manière significative l'effet anti-tumoral de l'oxaliplatine, 25 l'administration de MnDPDP à des souris traitées à l'oxaliplatine diminue de 63% le volume des tumeurs à un mois par rapport aux animaux traités seulement par l'oxaliplatine (Figure 35).

REVENDICATIONS

1) Utilisation d'un mimétique de superoxyde dismutase et de glutathion réductase pour l'obtention d'un médicament anti-cancéreux.

5 2) Utilisation selon la revendication 1, caractérisé en ce que ledit mimétique est le Mangafodipir.

3) Utilisation selon une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que ledit mimétique est utilisé en association avec un agent anti-tumoral capable 10 d'induire dans les cellules une production de formes réactives de l'oxygène.

15 4) Utilisation selon une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que ledit mimétique est utilisé pour protéger les cellules non tumorales des effets toxiques des agents anti-tumoraux générateurs de 20 formes réactives de l'oxygène.

25 5) Utilisation selon une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que ledit agent anti-tumoral est choisi parmi la doxorubicine, la mitomycine C, l'étoposide, les dérivés de platine, le tamoxifène, le taxol, le 5-fluoro-uracile, l'irinotécan, la gemcitabine, l'endoxan, la streptozotocine, la bléomycine, la vincristine.

30 6) Composition pharmaceutique comprenant un mimétique de superoxyde dismutase et de glutathion réductase, associé avec un agent anti-tumoral capable d'induire dans les cellules une production de formes réactives de l'oxygène.

35 7) Composition pharmaceutique selon la revendication 6, caractérisée en ce que ledit mimétique est le Mangafodipir.

8) Composition pharmaceutique selon une quelconque des revendications 6 ou 7, caractérisée en ce que ledit agent anti-tumoral est choisi parmi la doxorubicine, la mitomycine C, l'étoposide, les dérivés de platine, le tamoxifène, le taxol, le 5-fluoro-uracile, l'irinotécan, la gemcitabine, l'endoxan, la streptozotocine, la bléomycine, la vincristine.

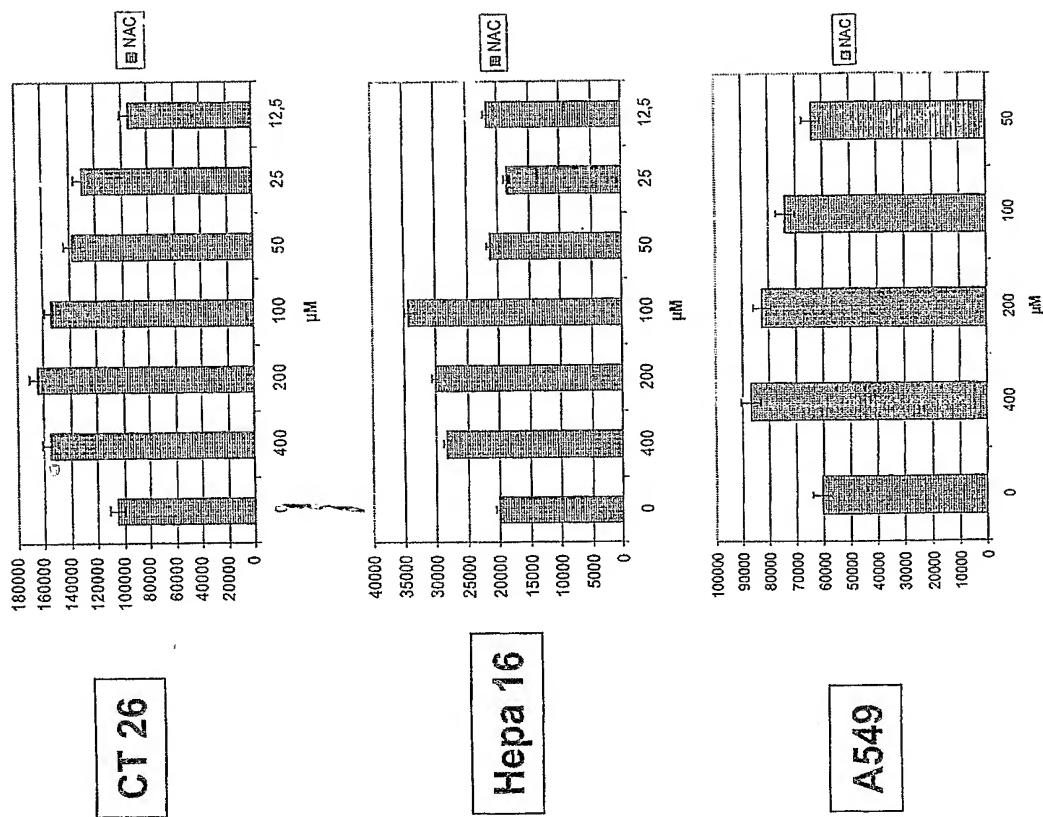


Figure 1

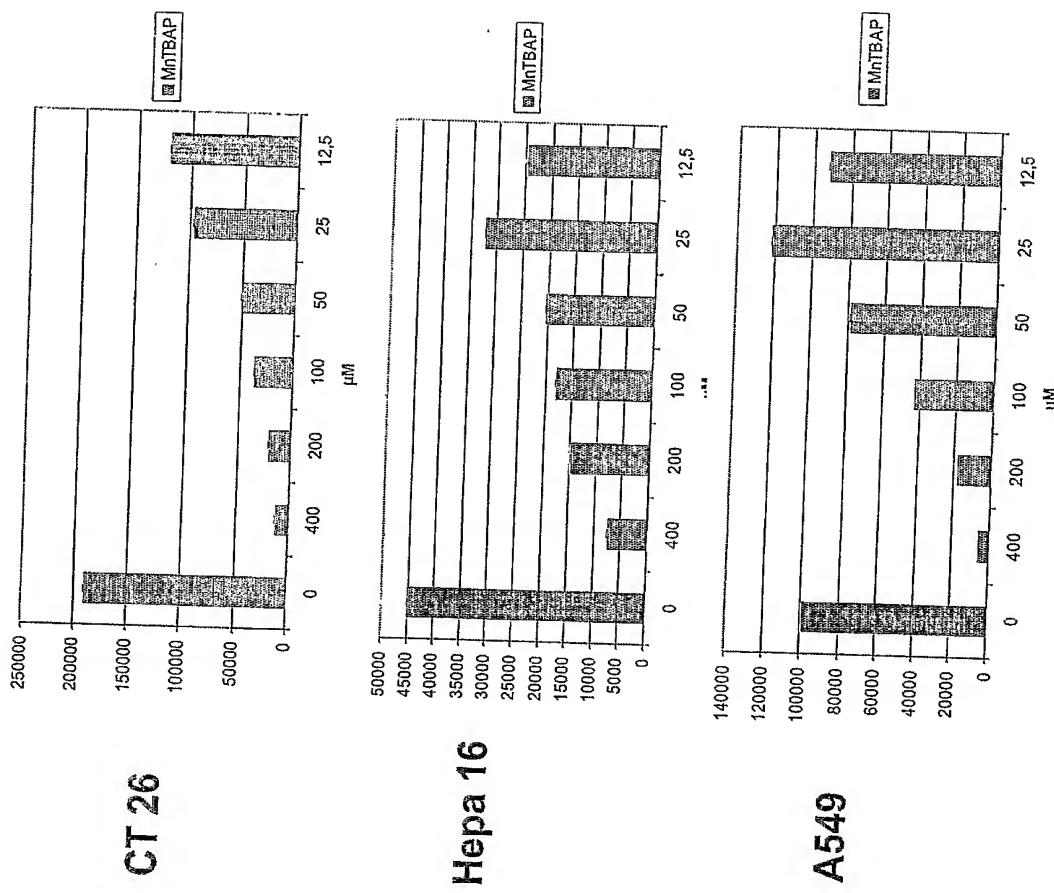
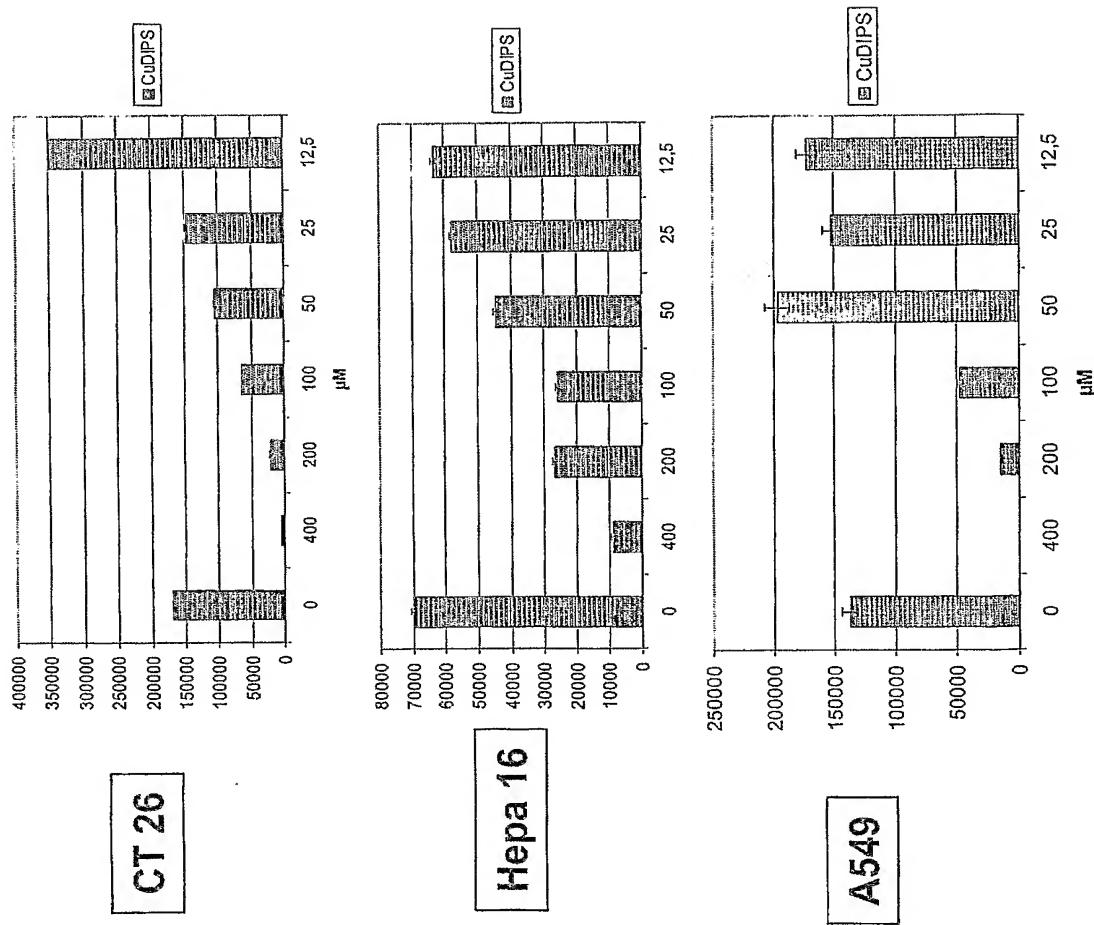


Figure 2

**Figure 3**

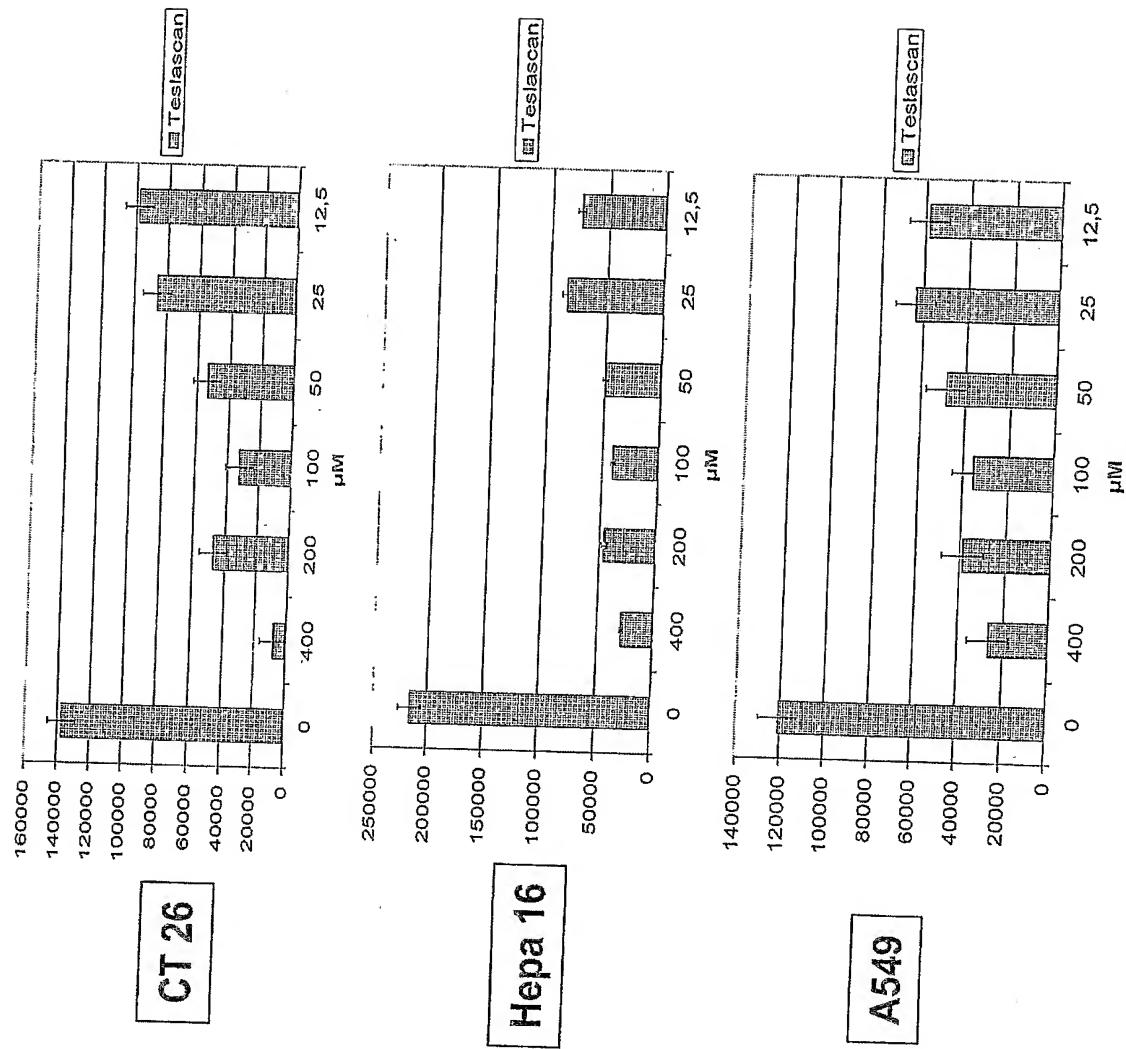


Figure 4

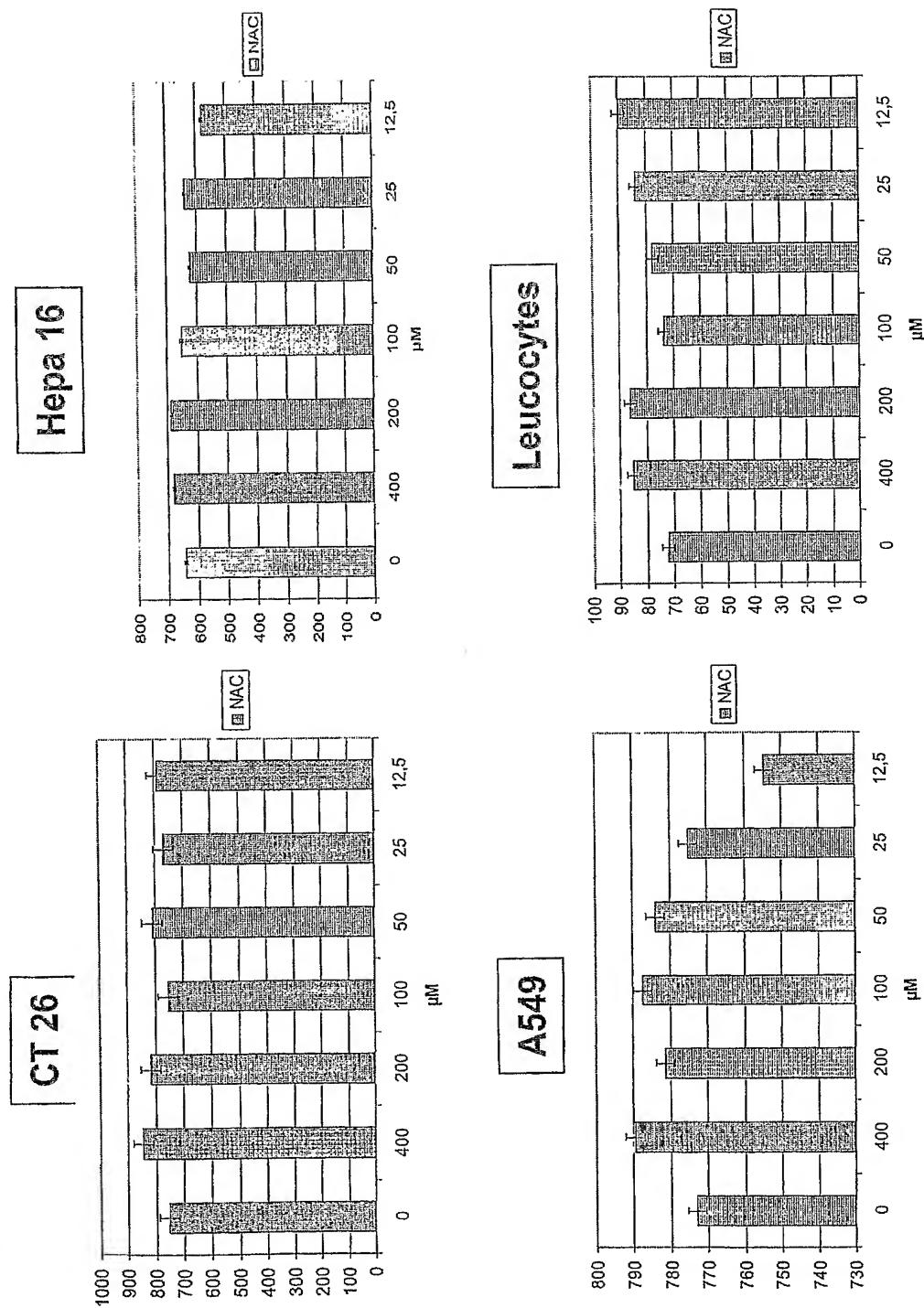


Figure 5

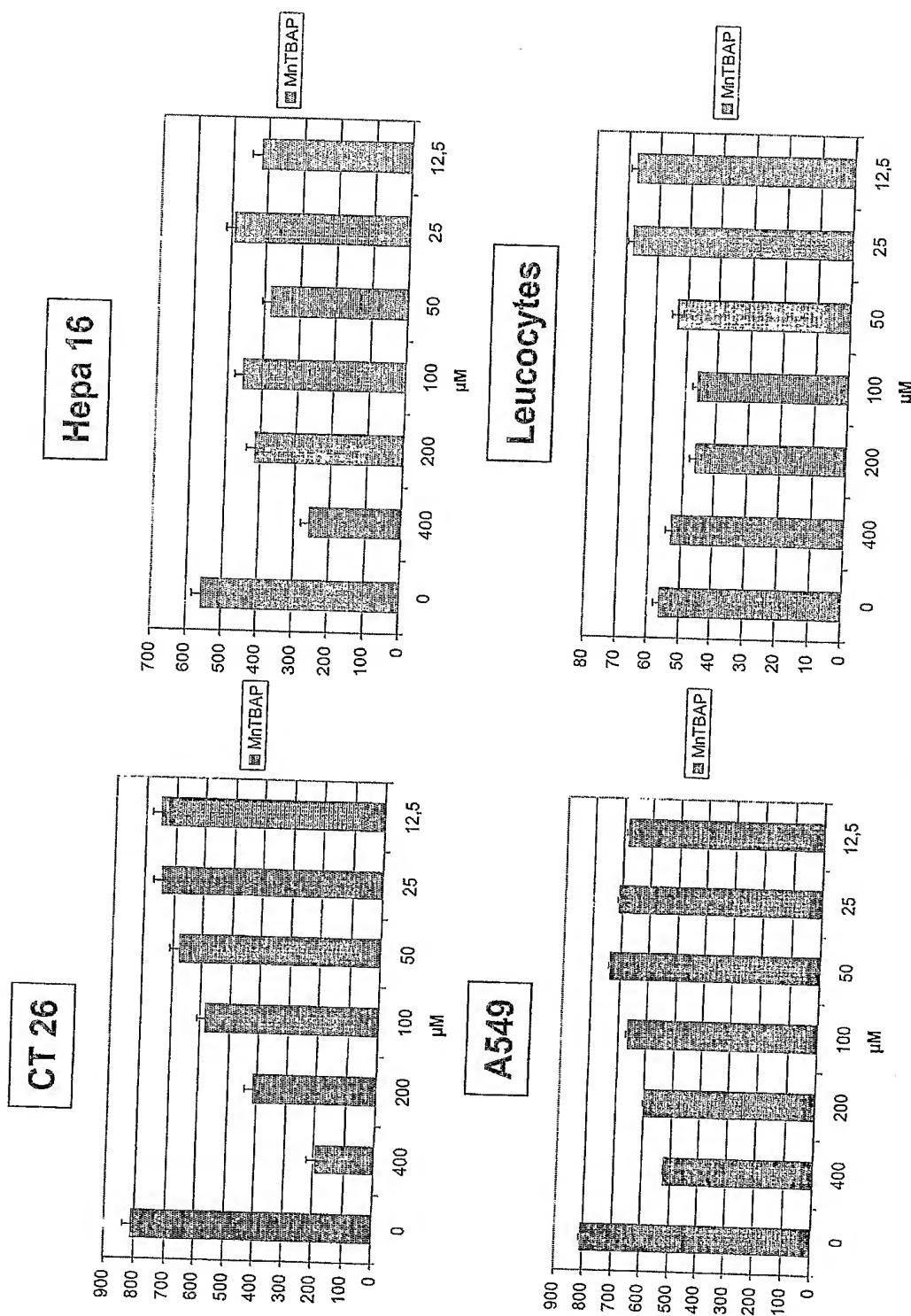


Figure 6

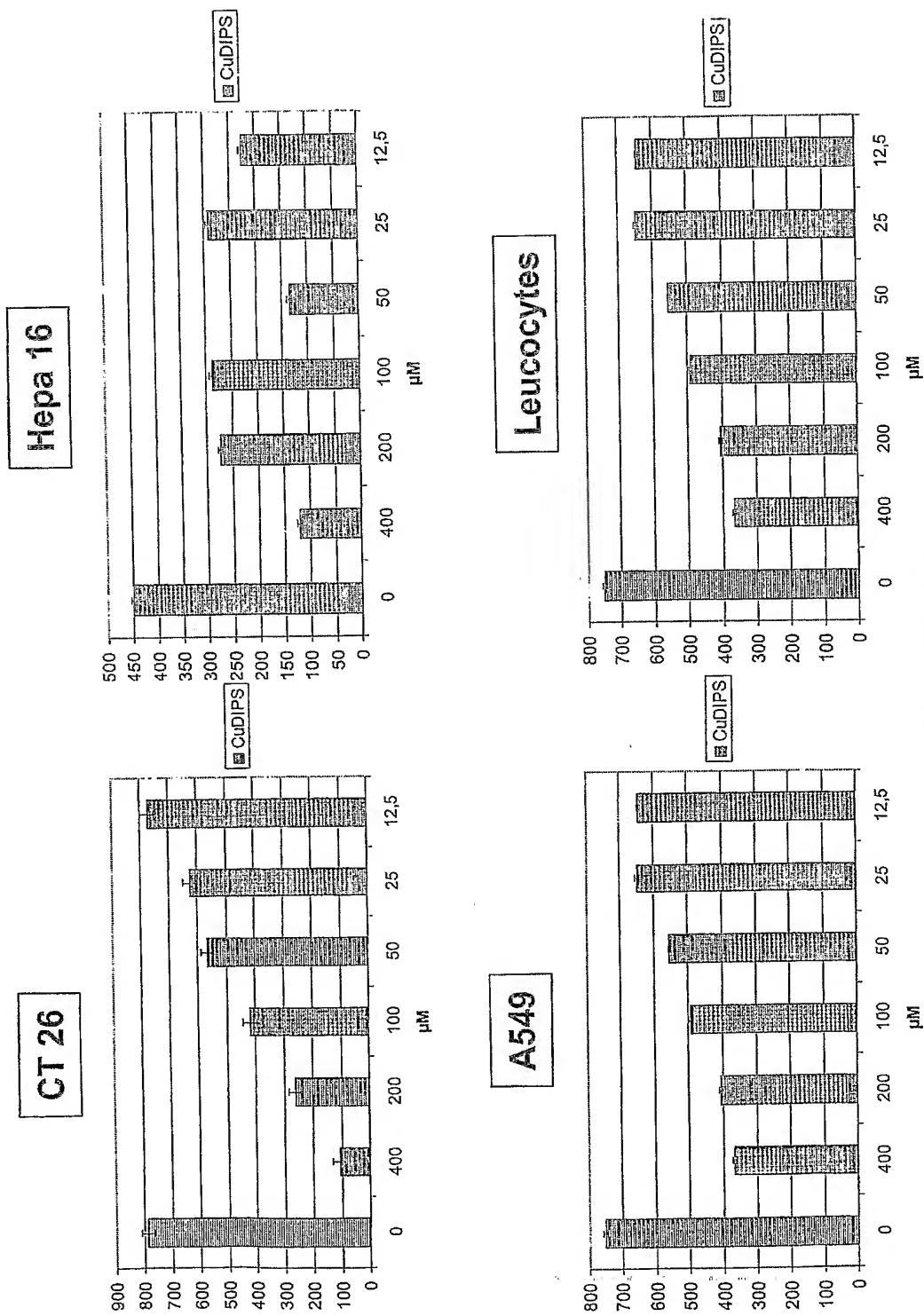


Figure 7

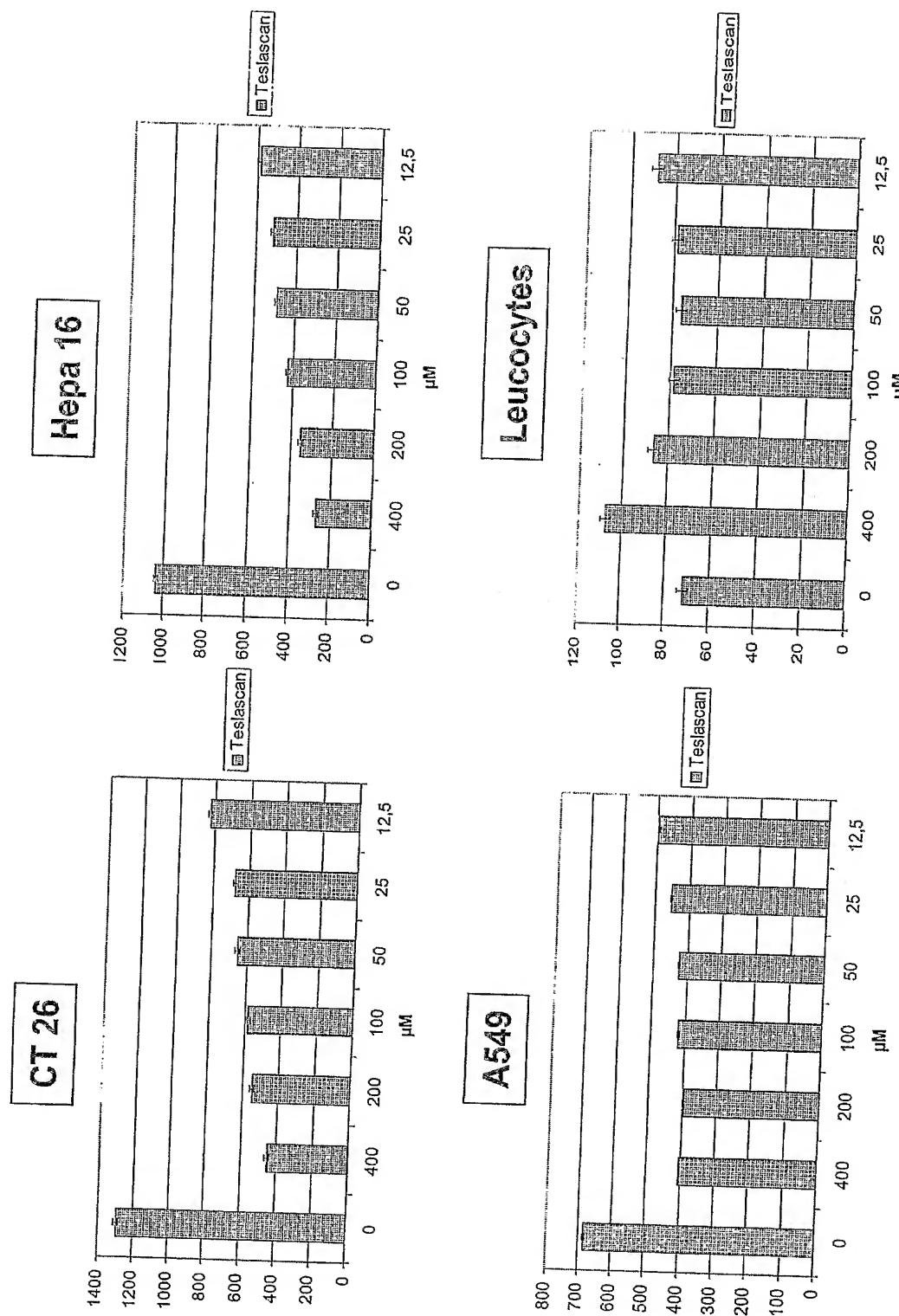


Figure 8

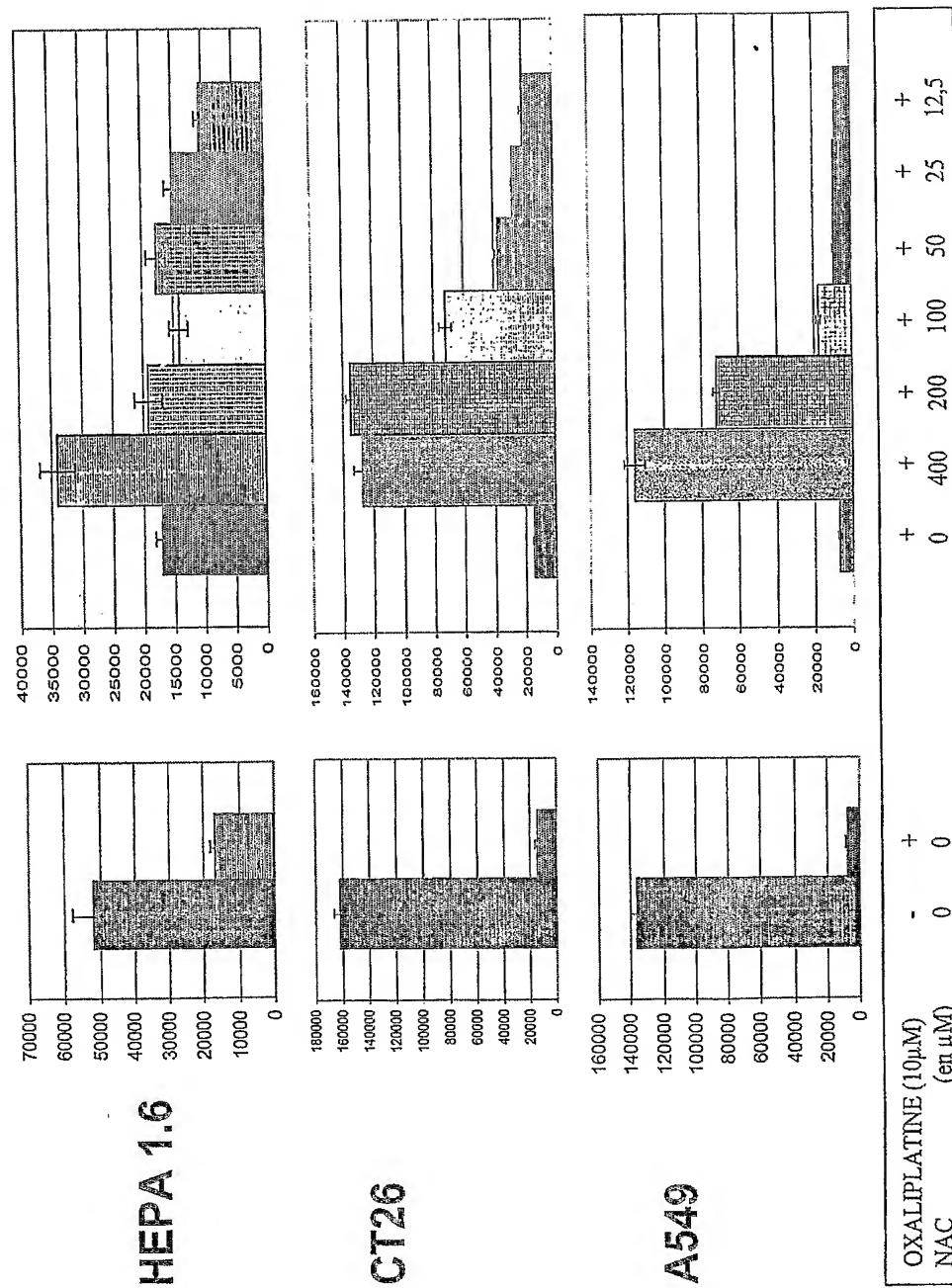


Figure 9

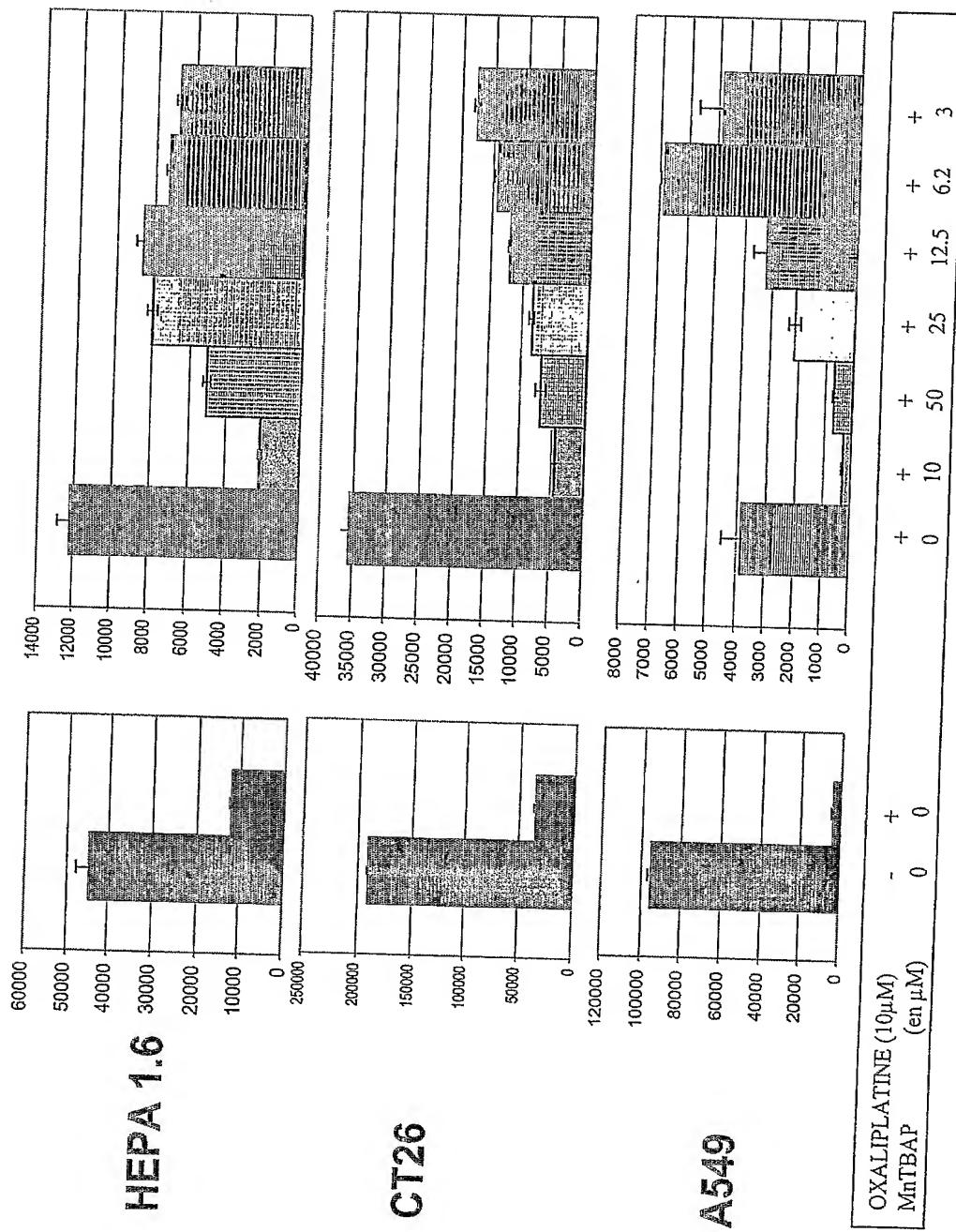


Figure 10

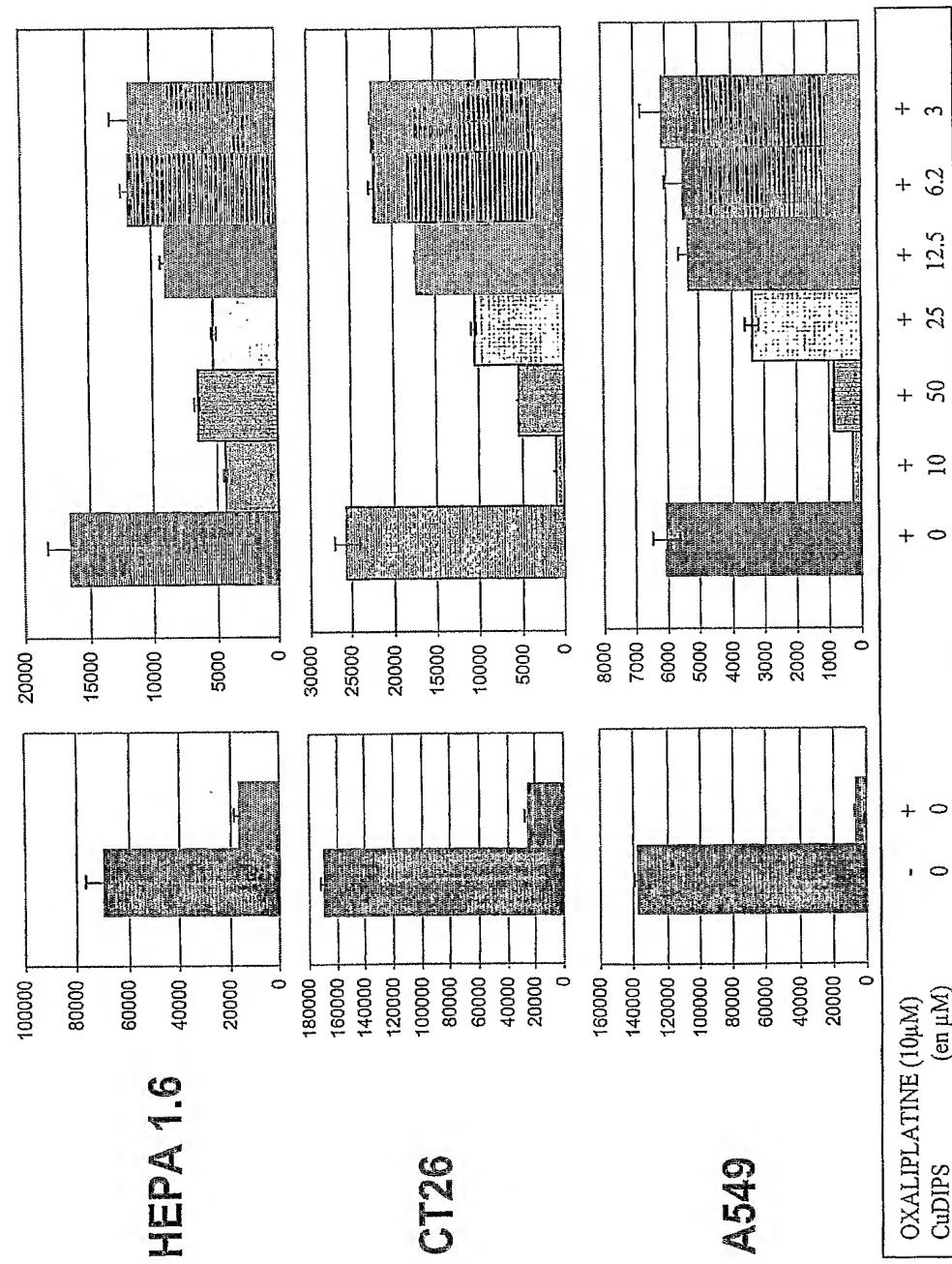


Figure 11

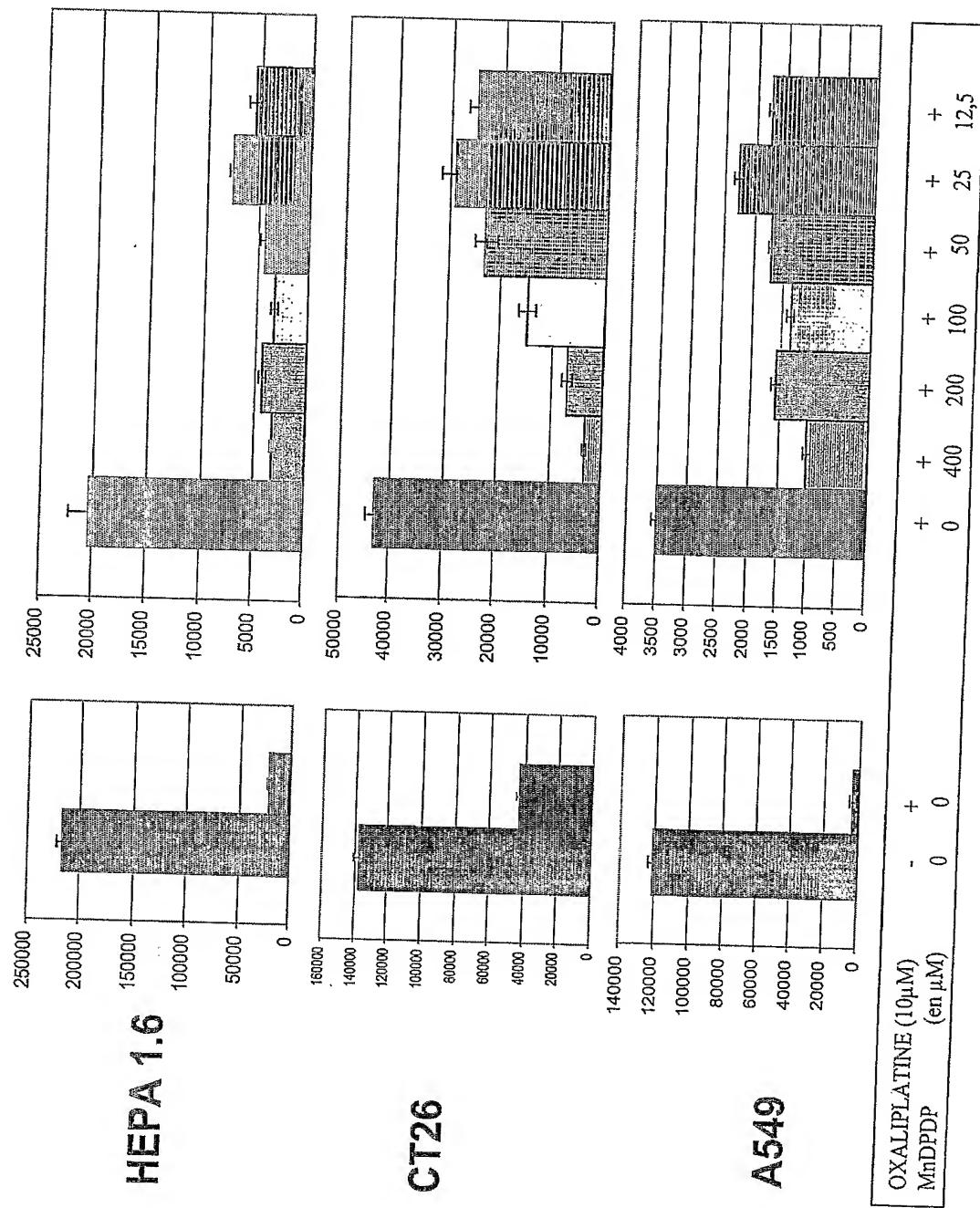


Figure 12

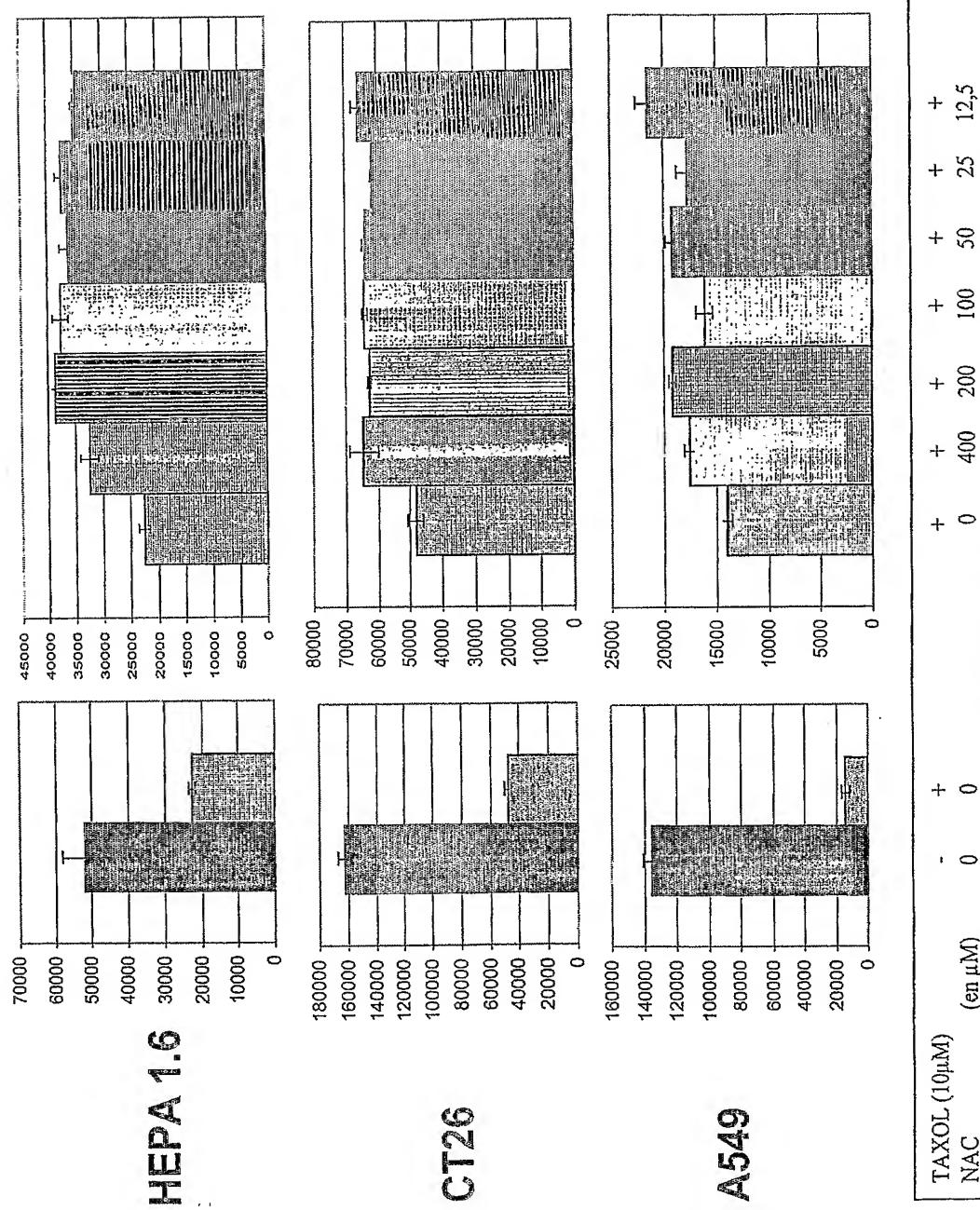


Figure 13

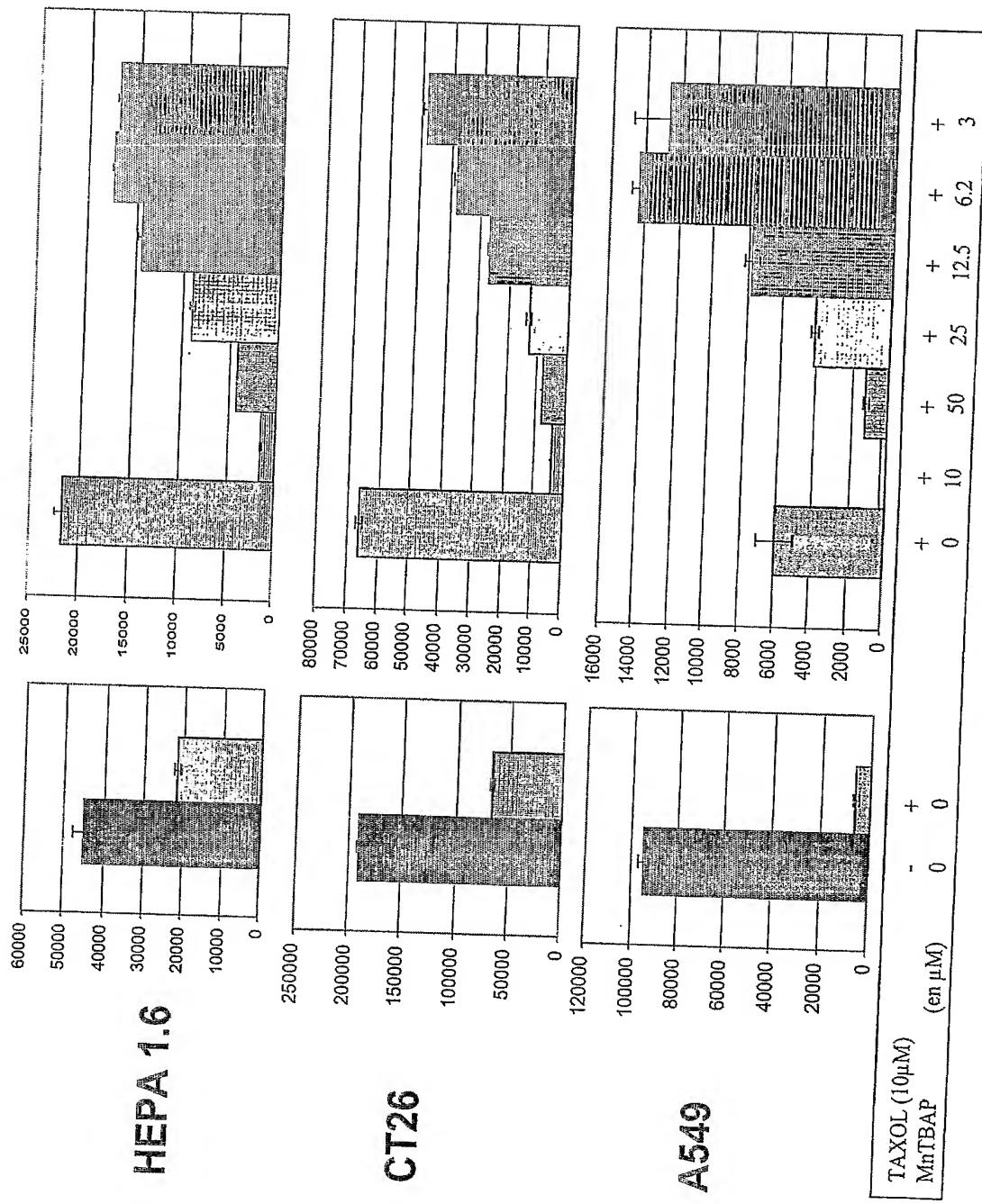


Figure 14

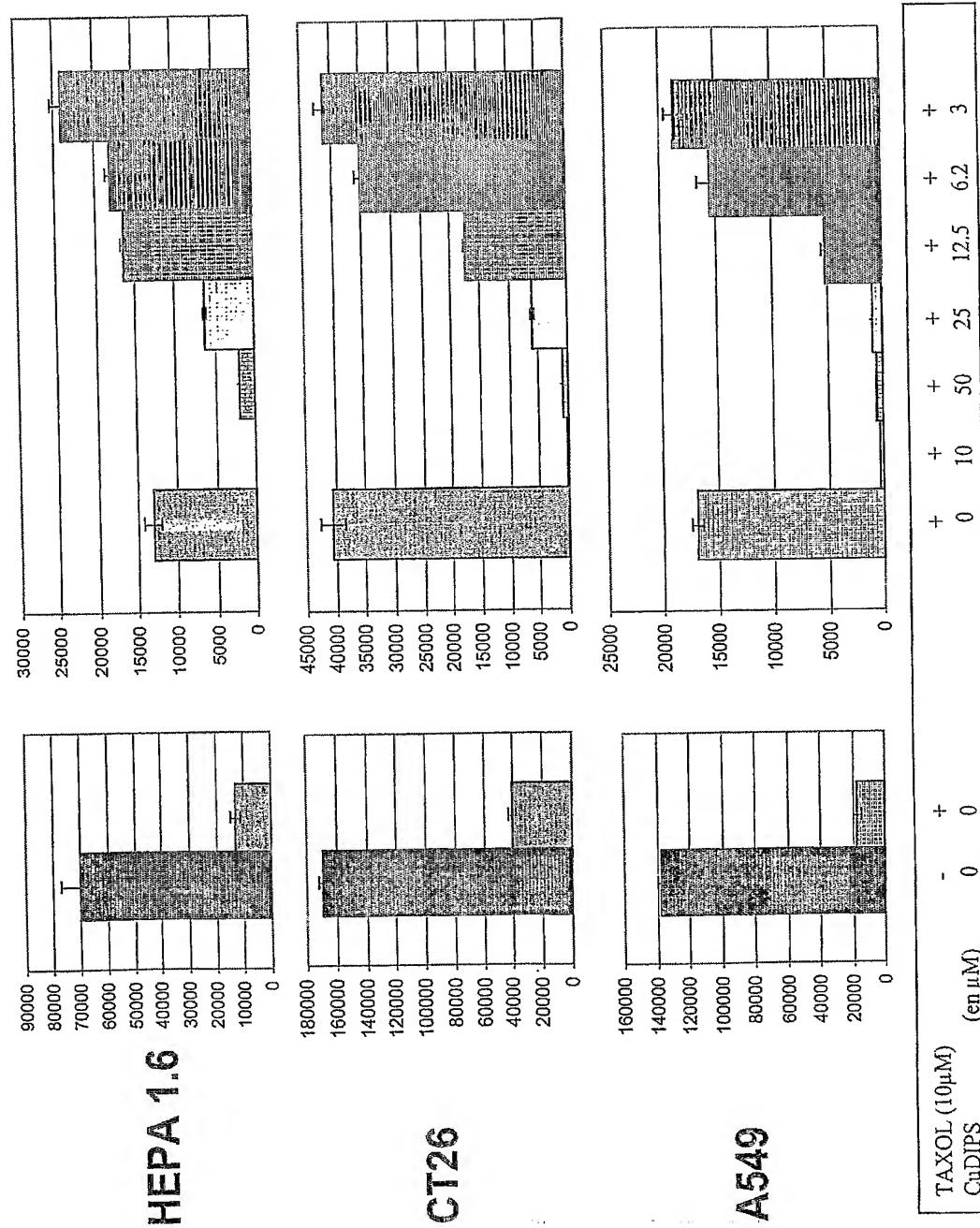


Figure 15

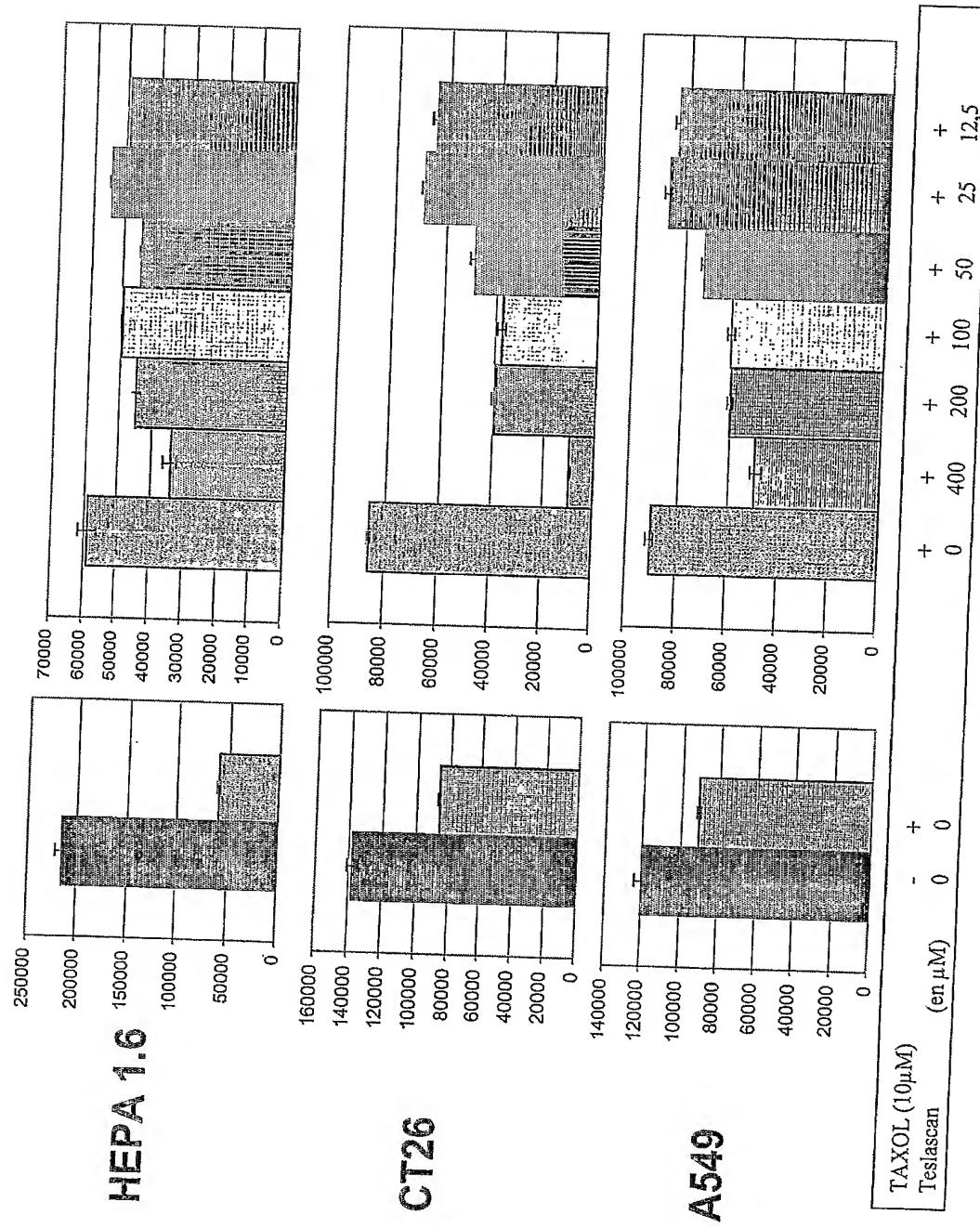


Figure 16

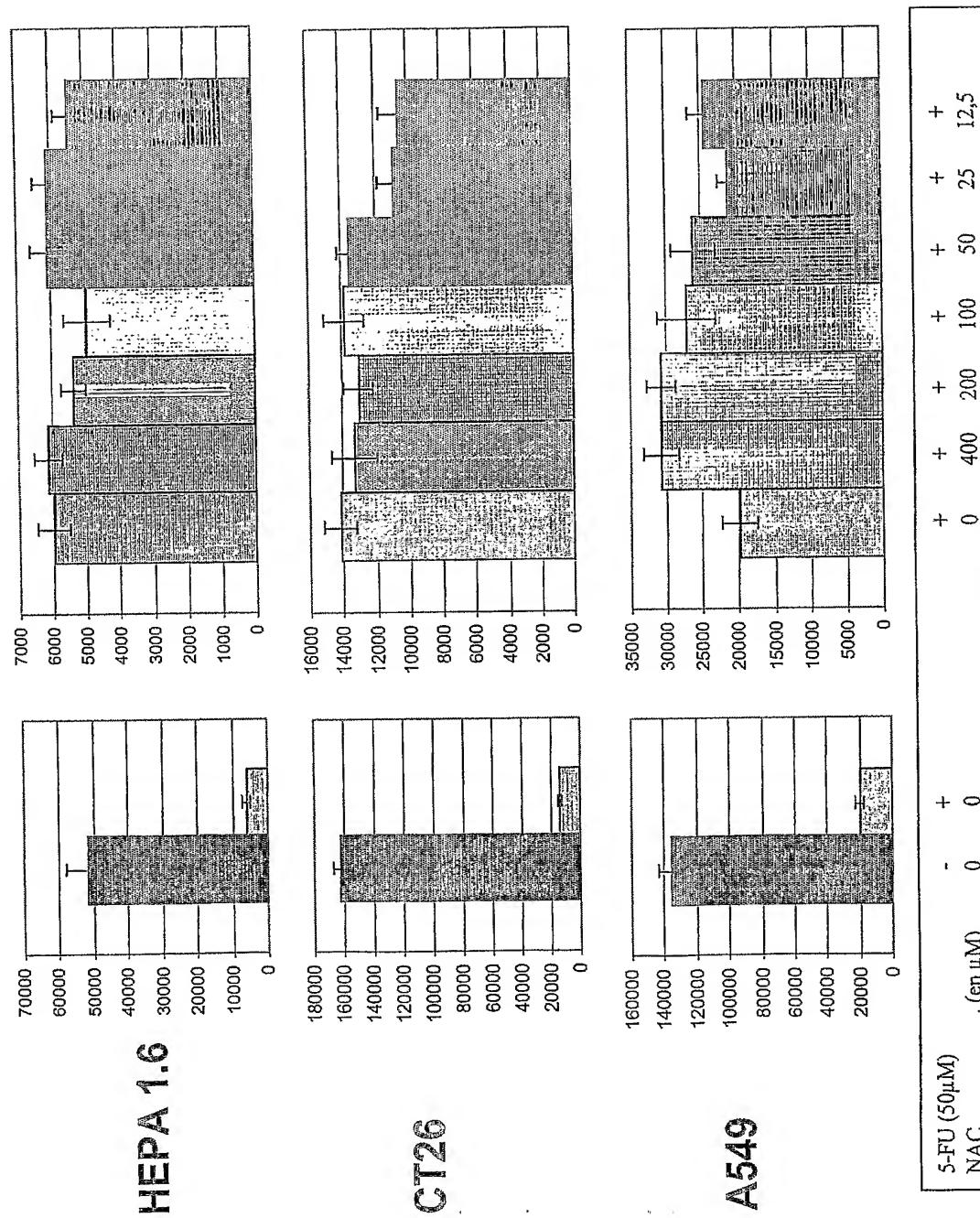


Figure 17



Figure 18

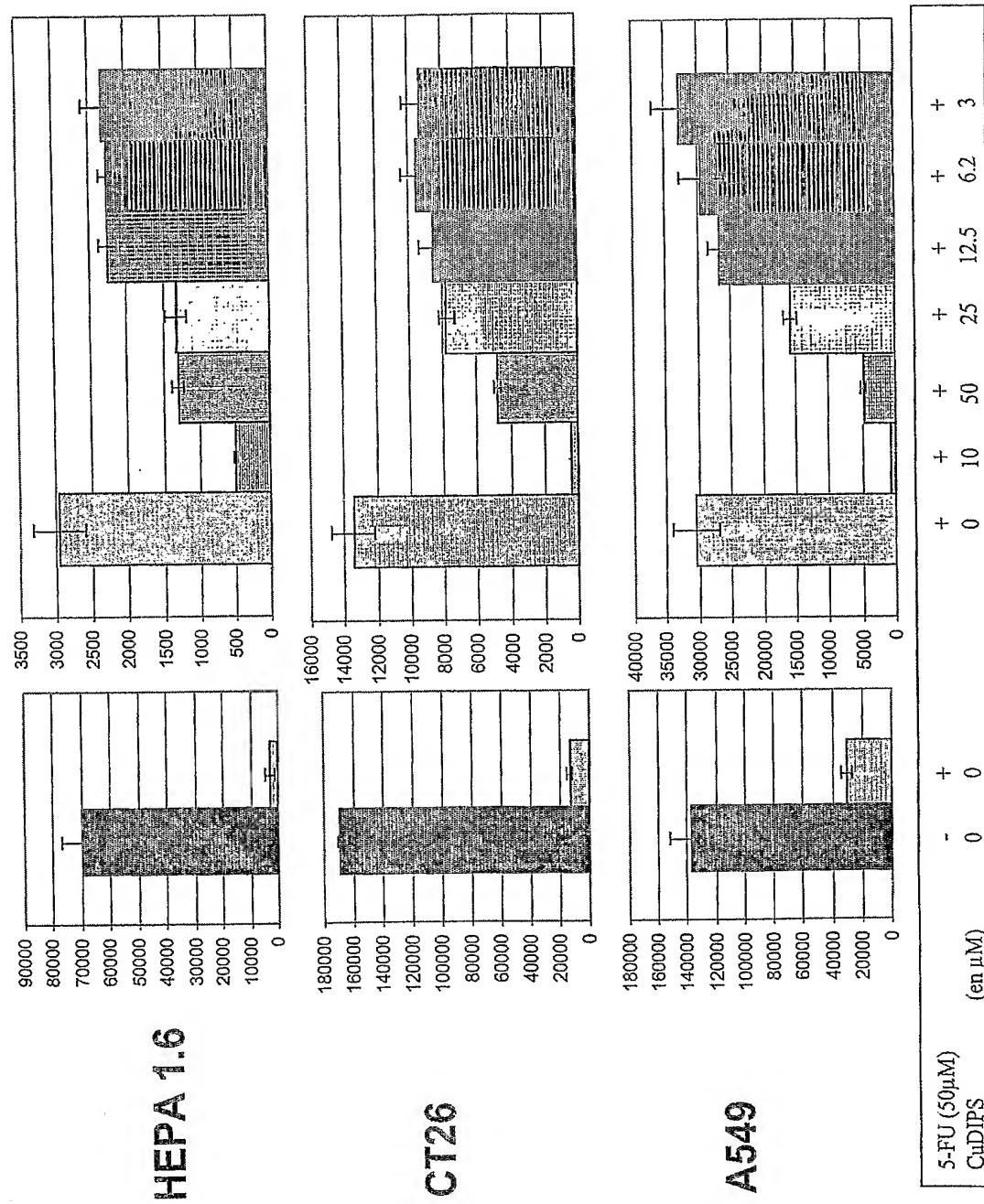


Figure 19

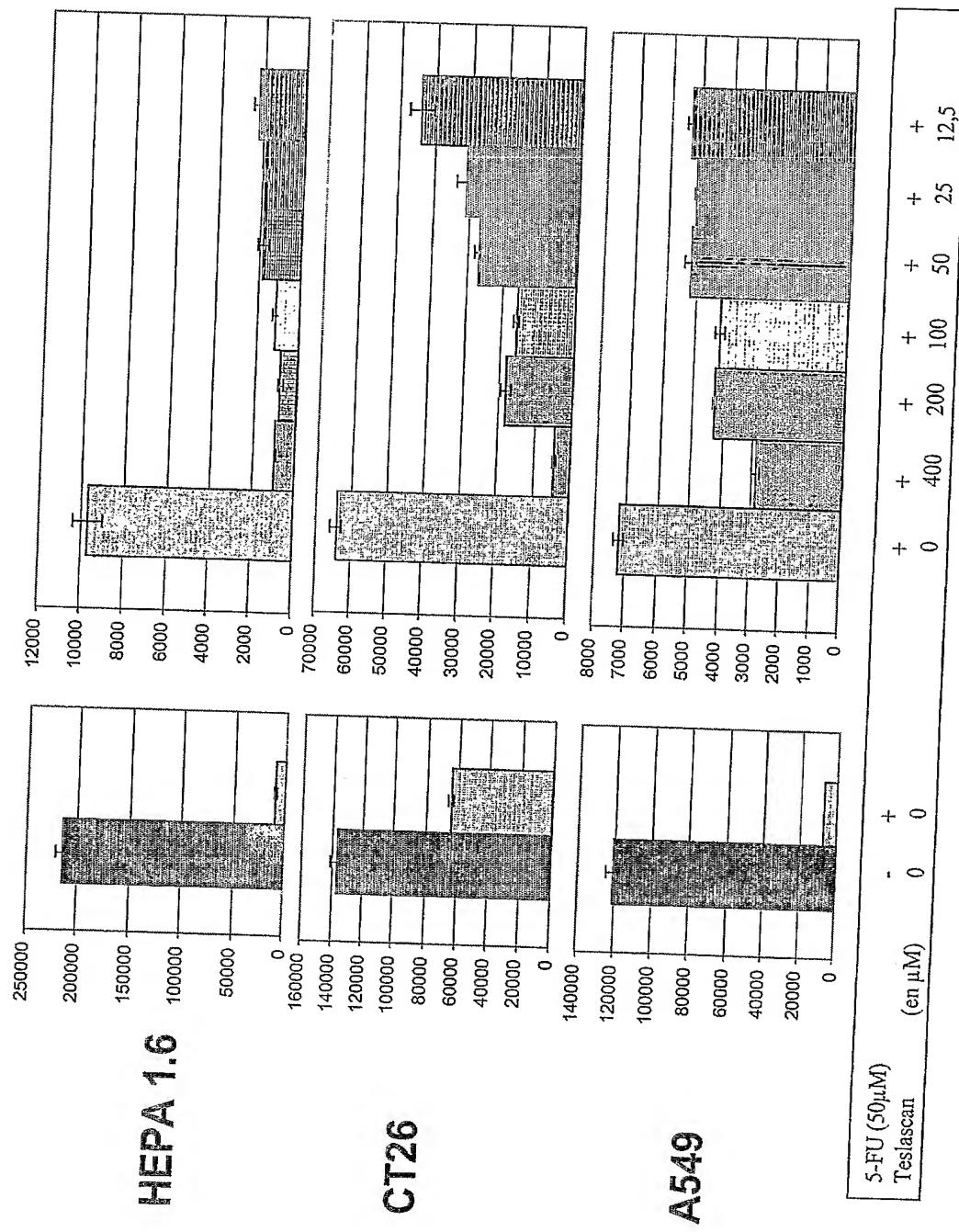


Figure 20

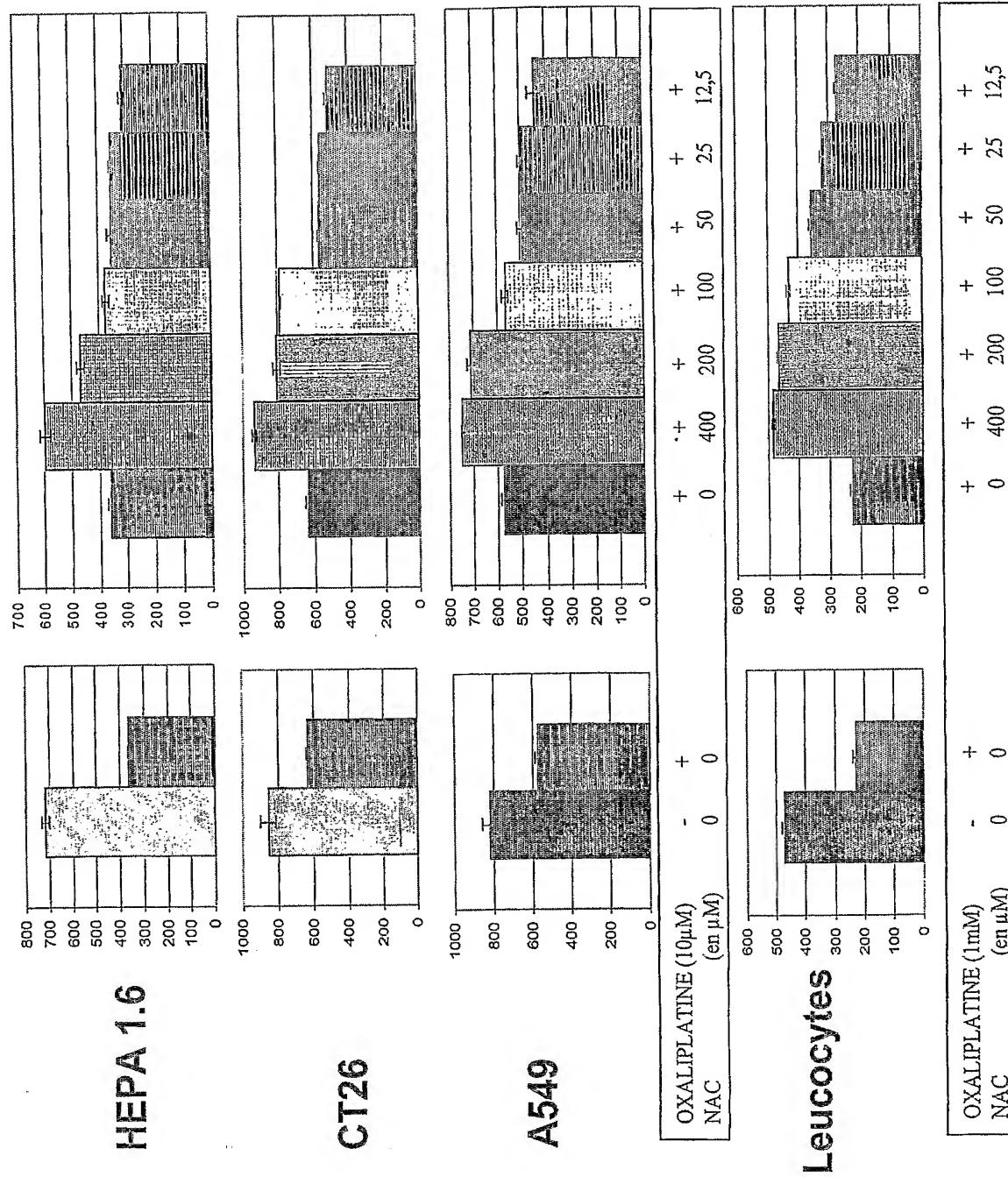


Figure 21

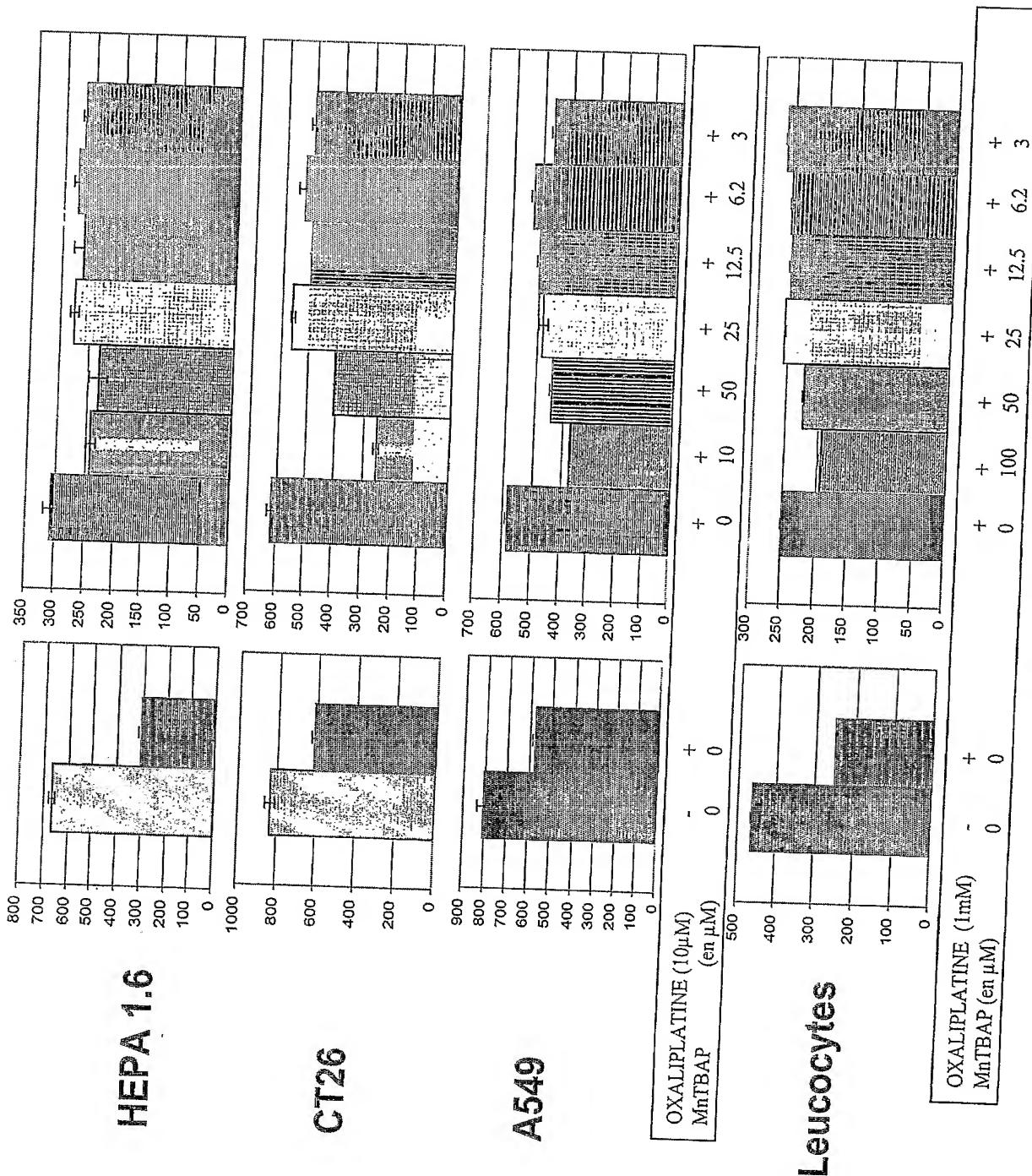


Figure 22

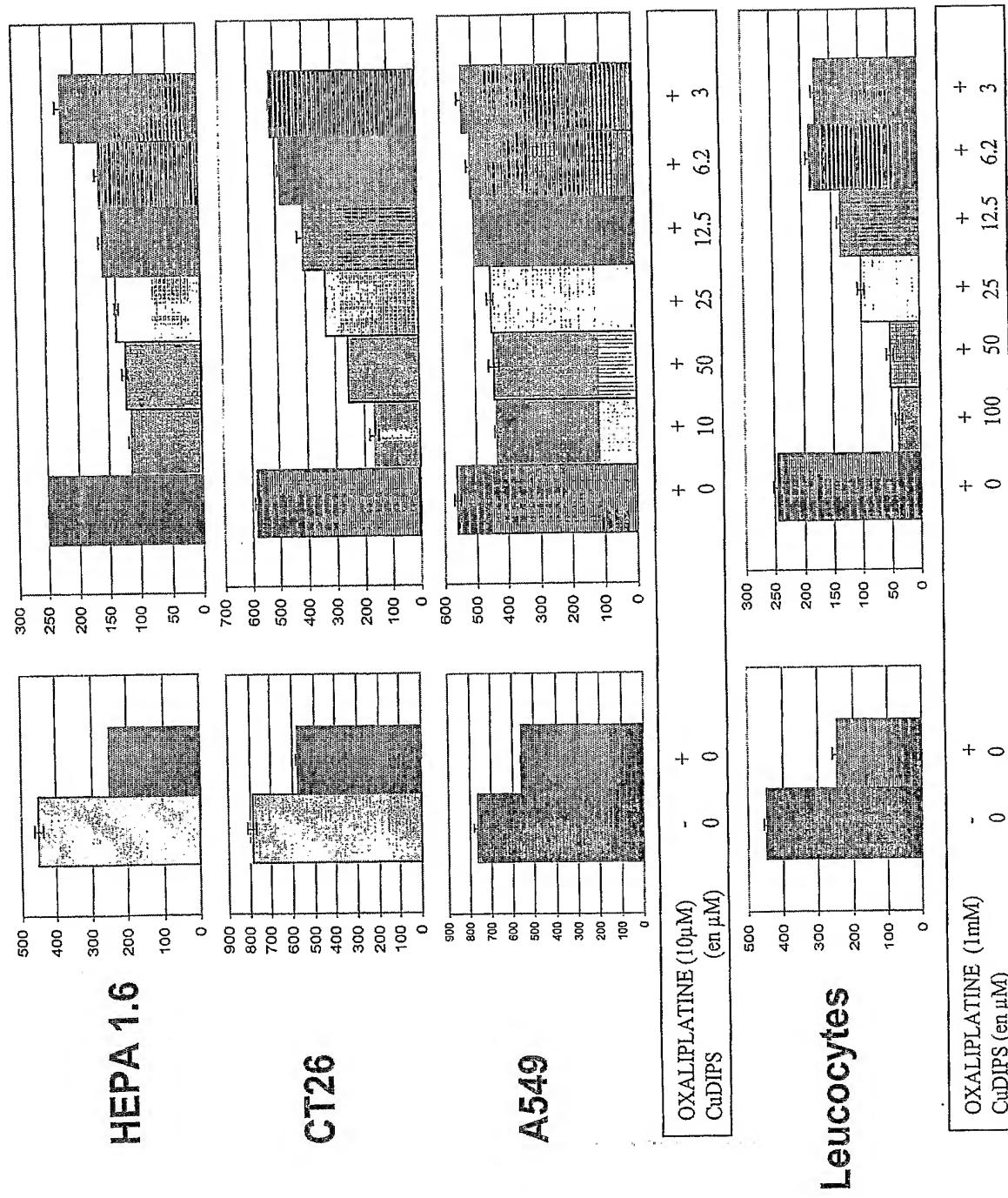


Figure 23

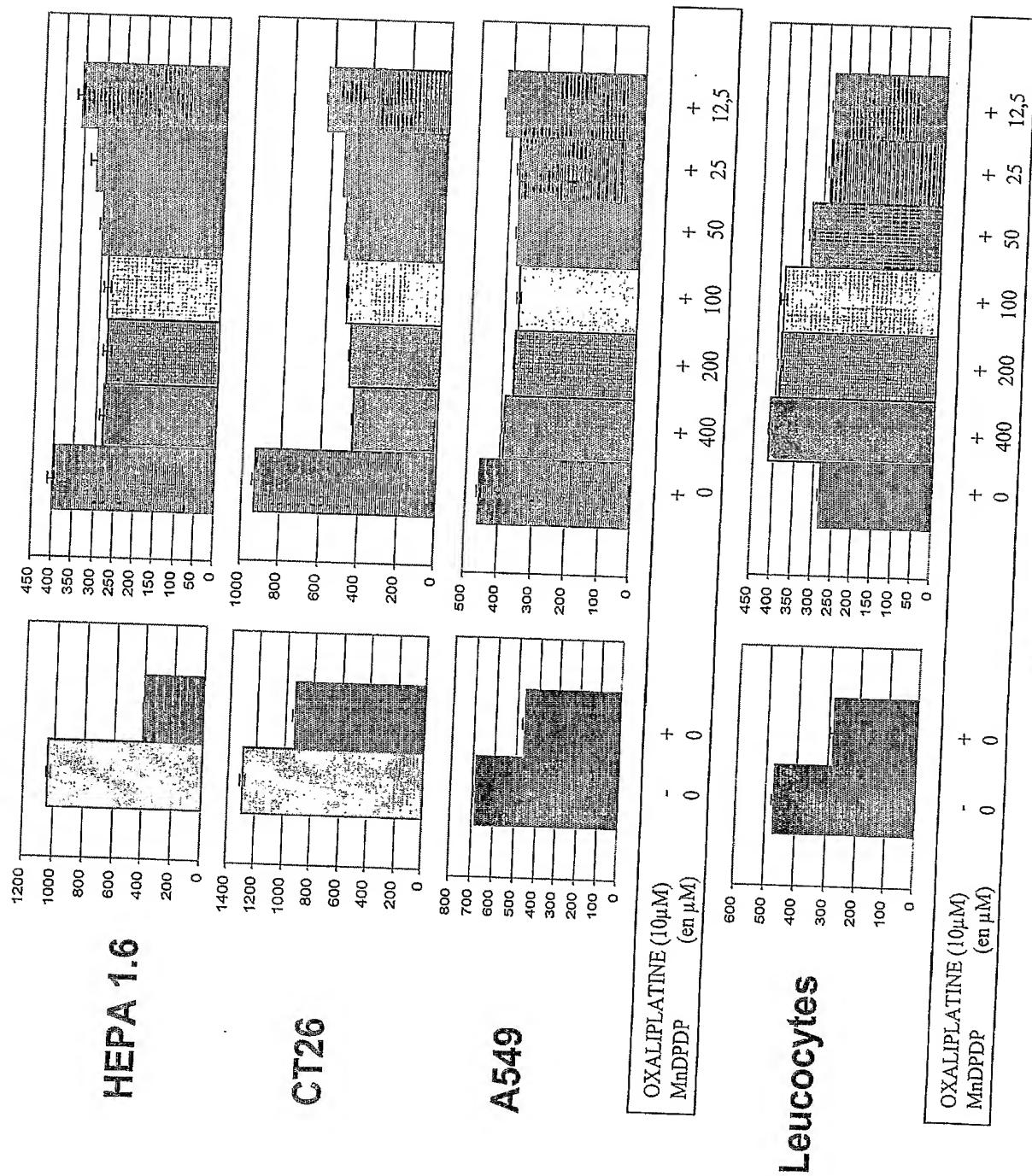


Figure 24

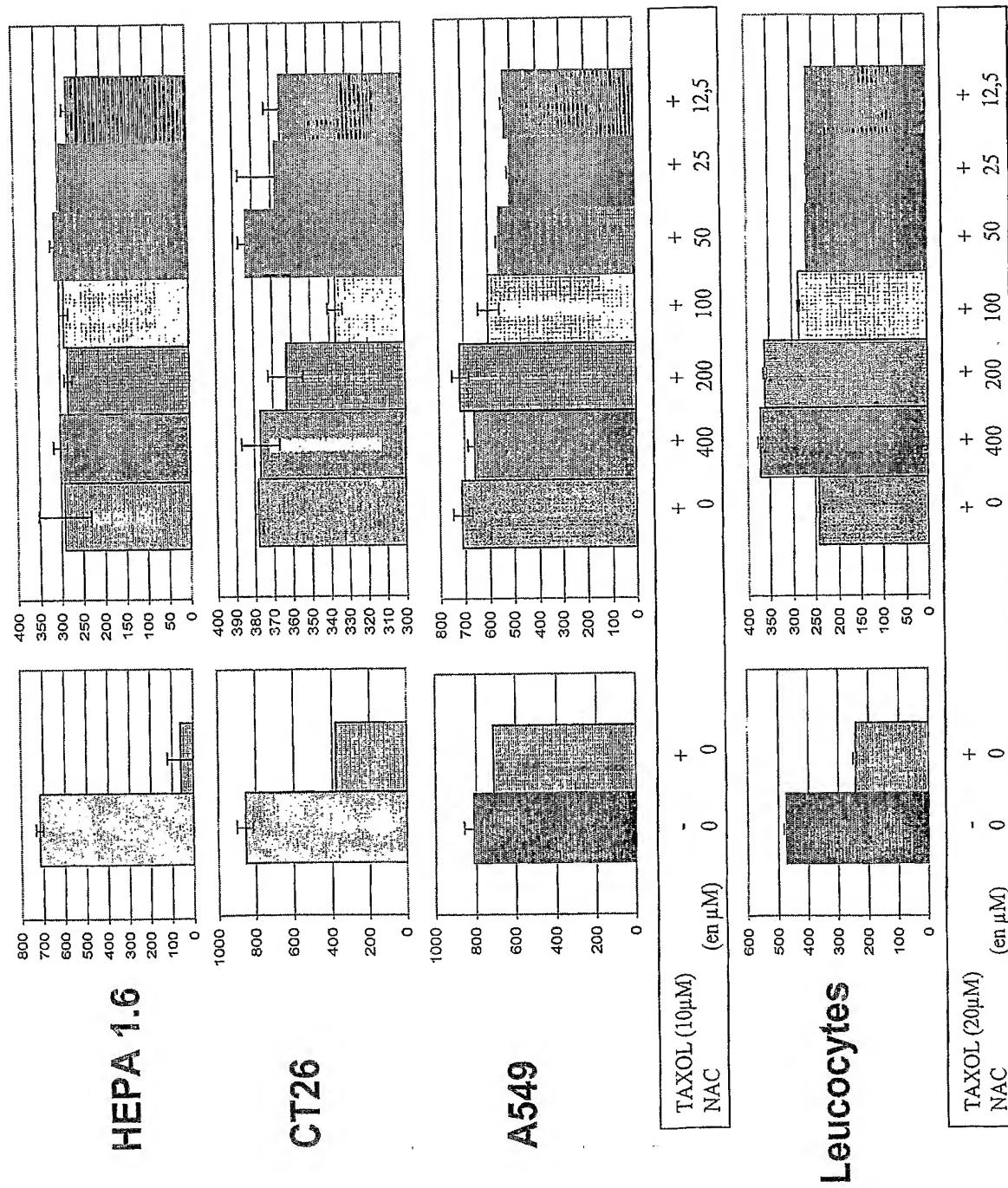


Figure 25

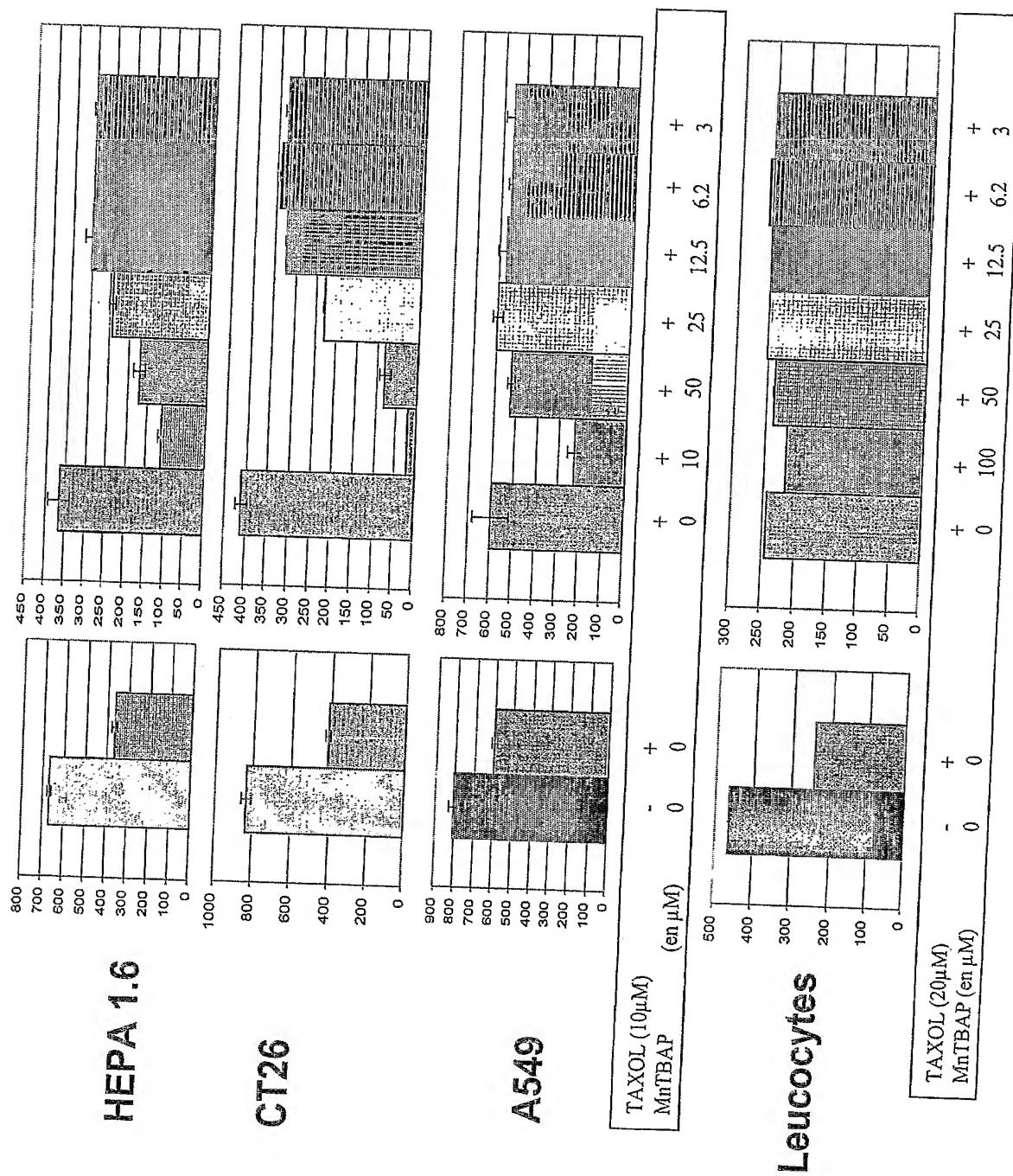


Figure 26

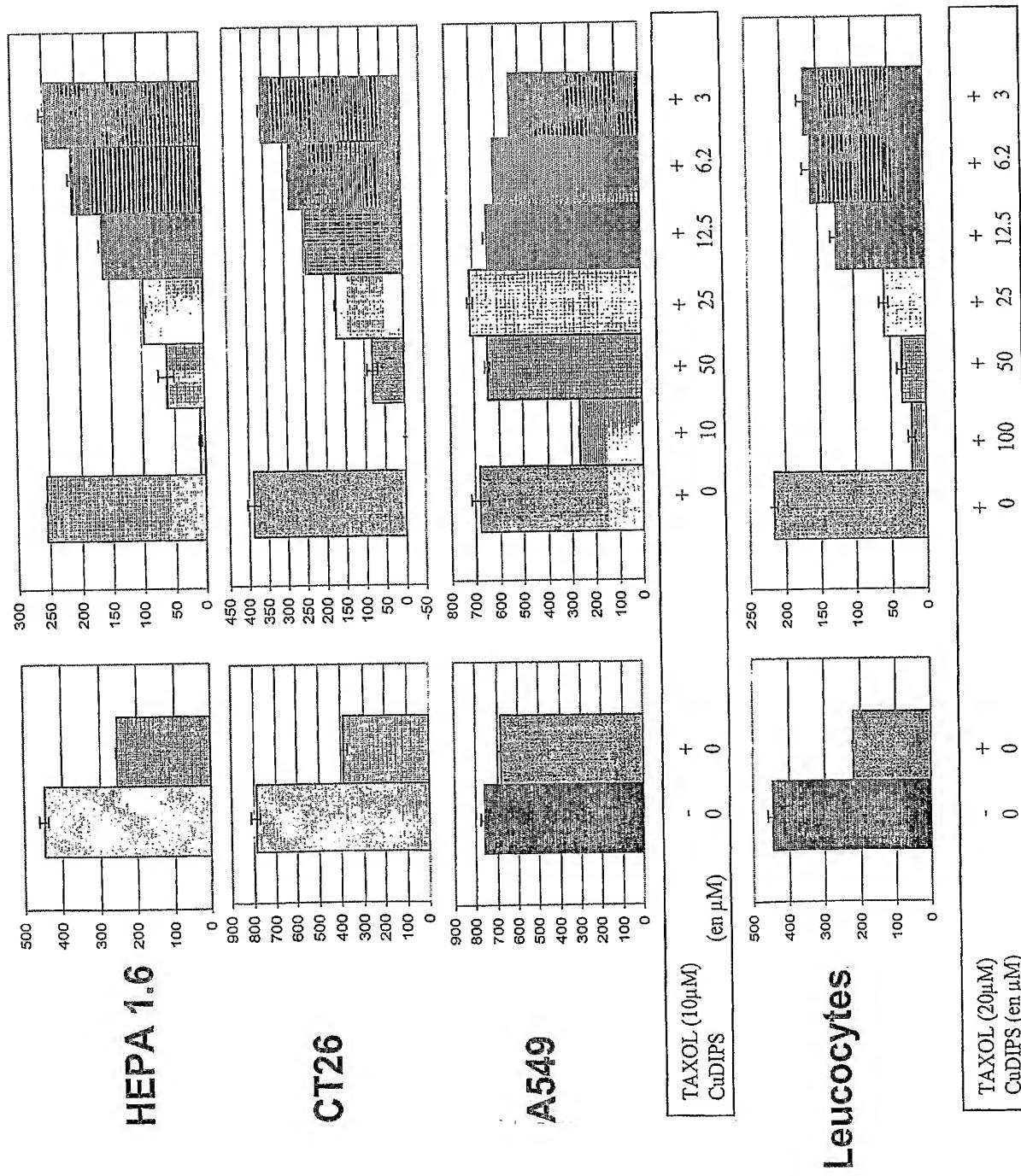


Figure 27

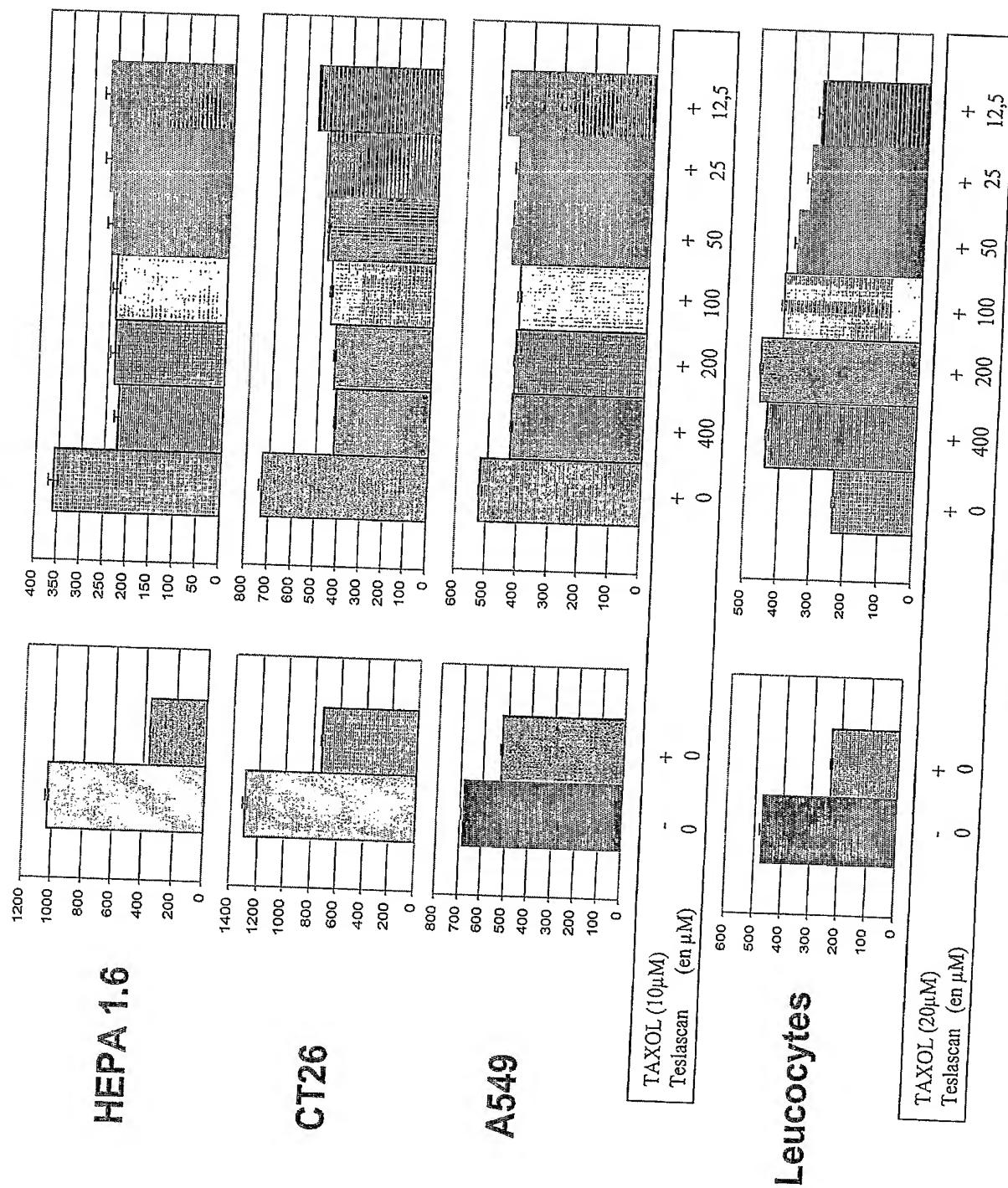


Figure 28

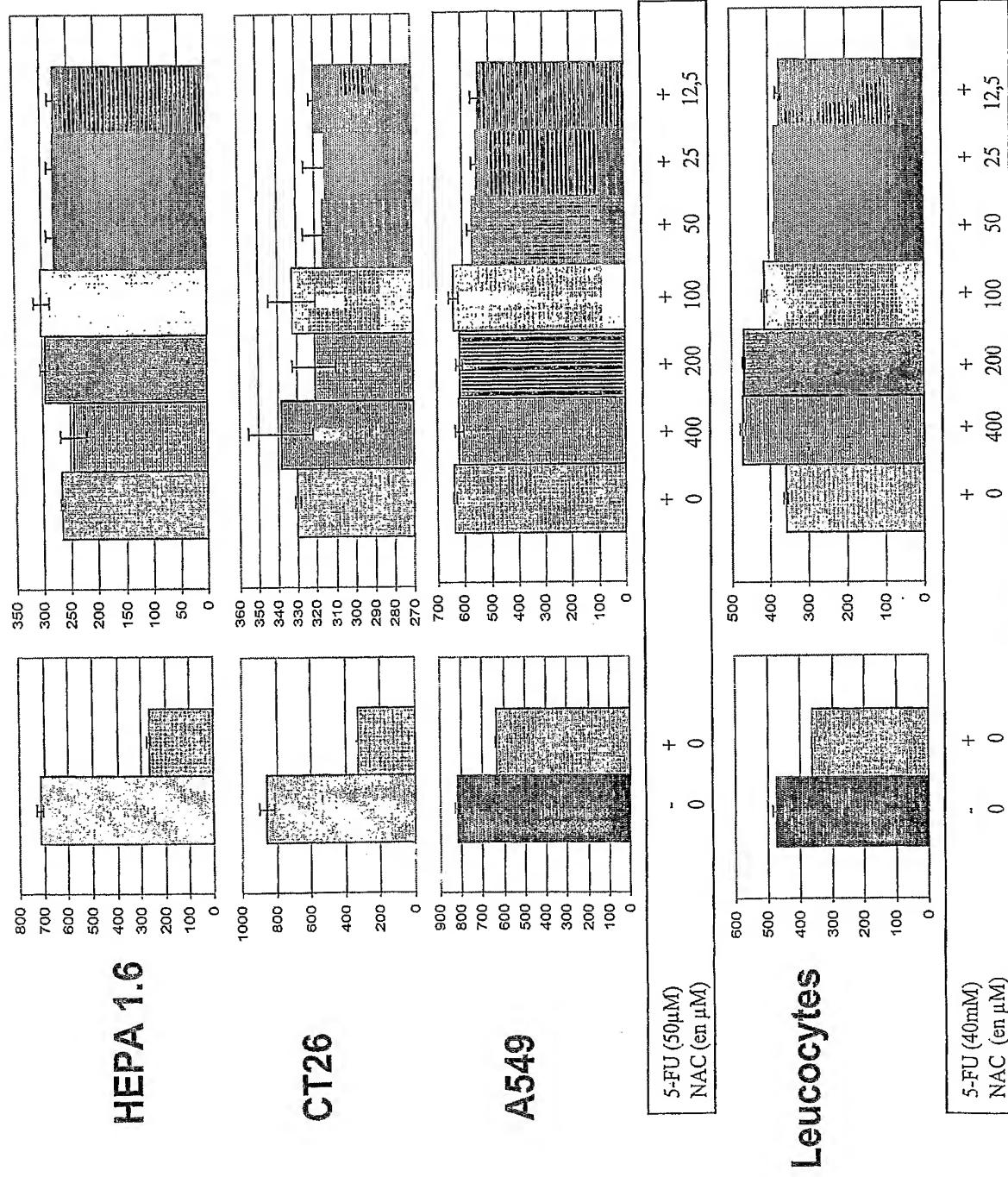


Figure 29

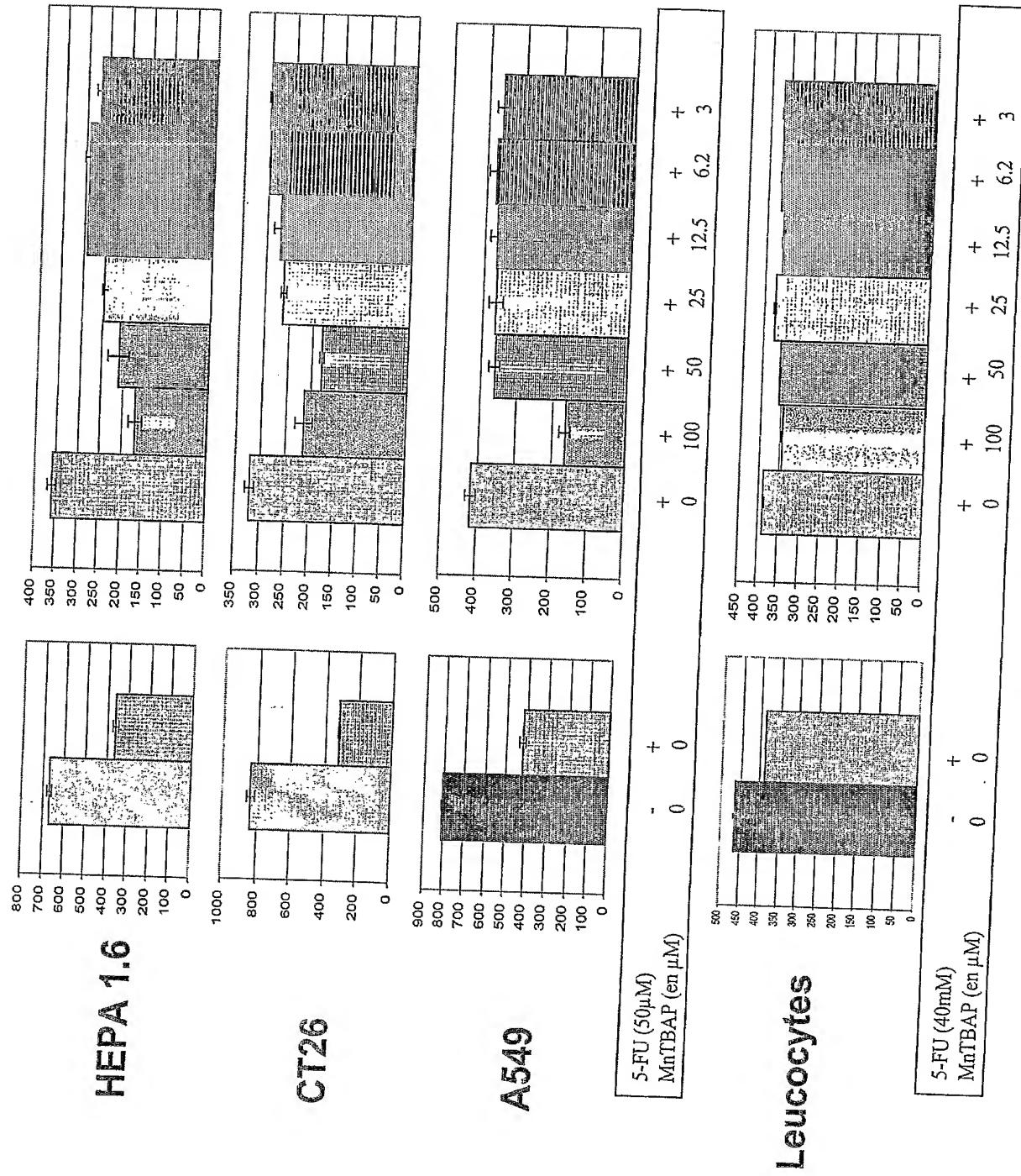


Figure 30

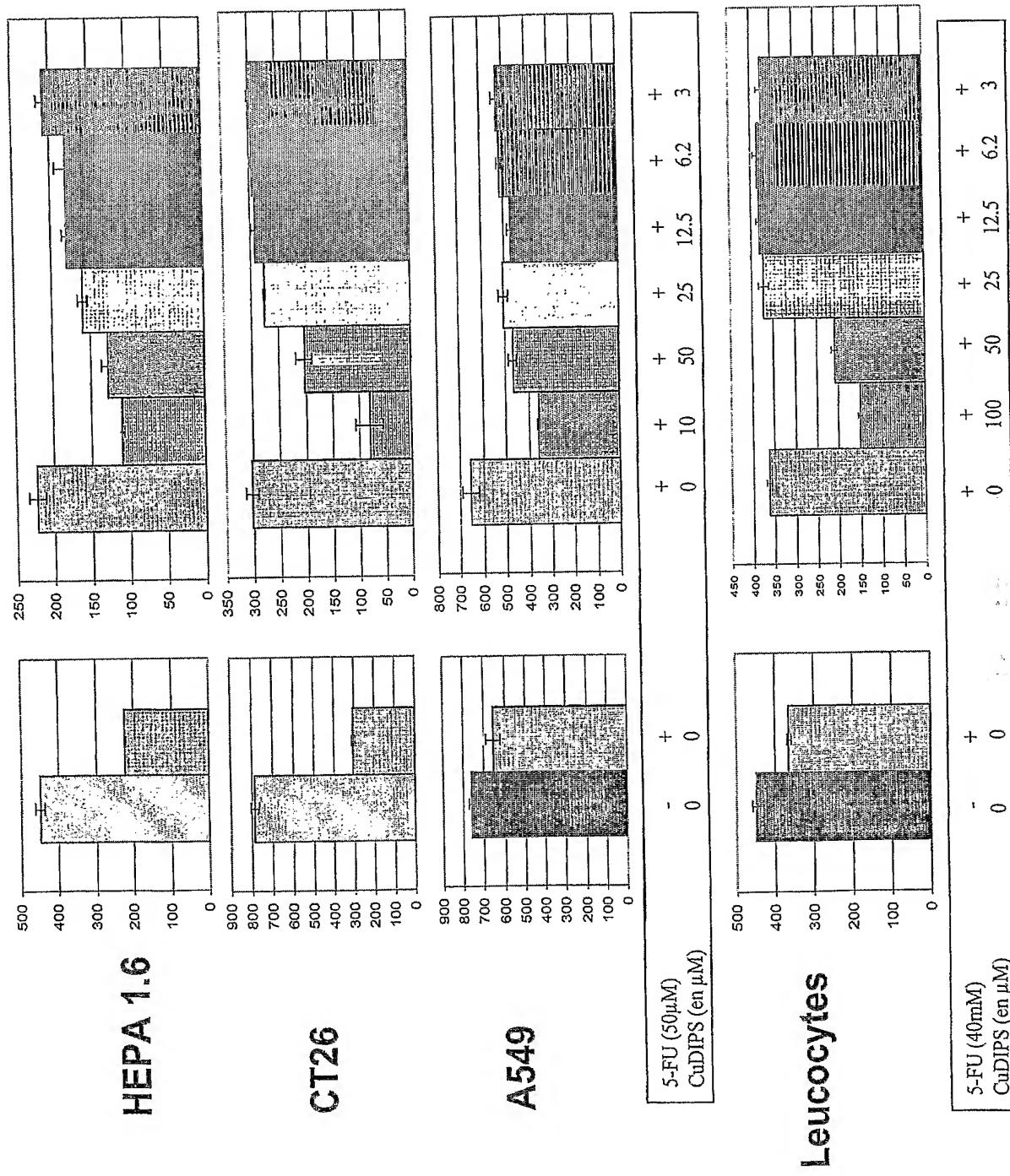


Figure 31

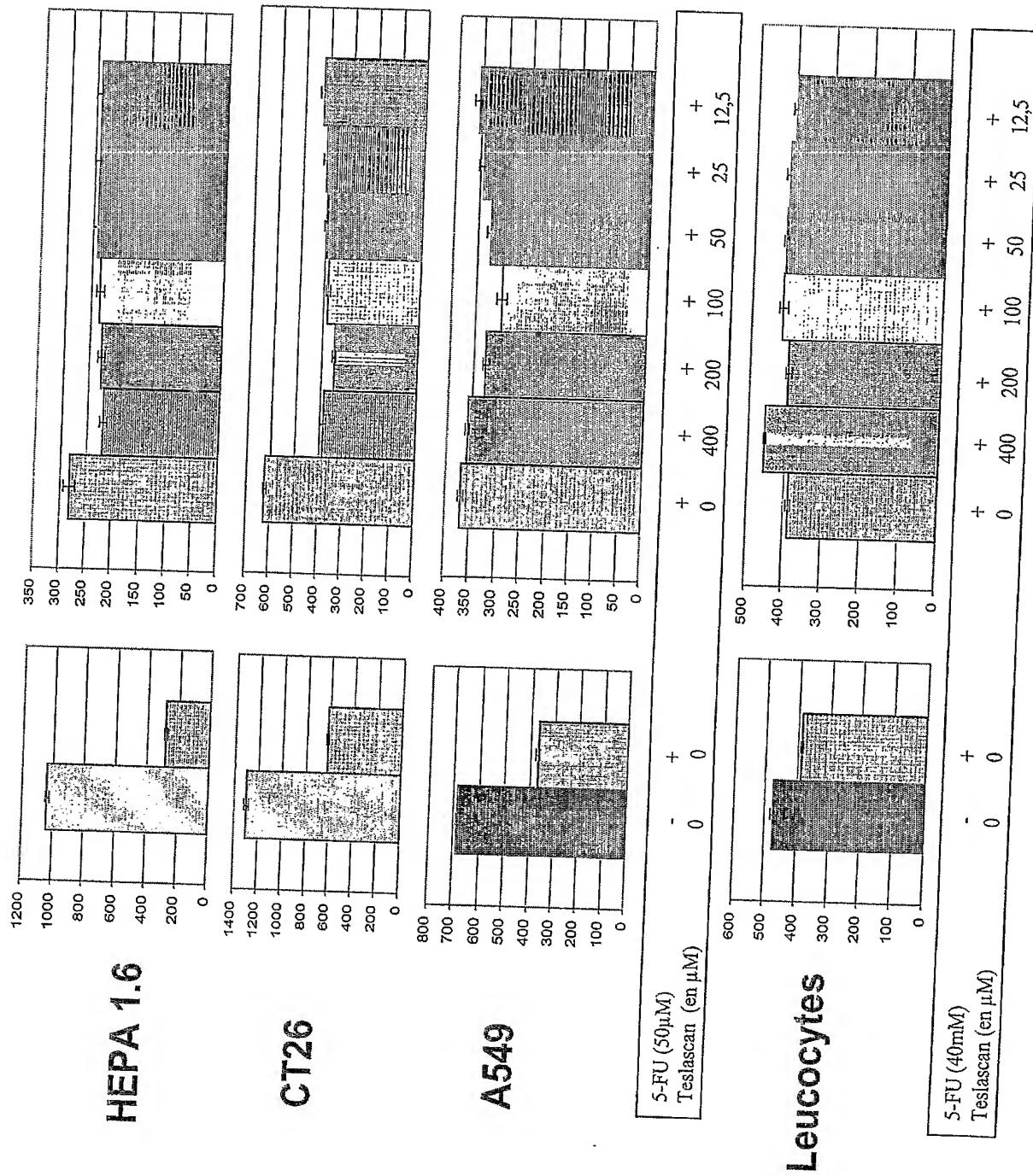


Figure 32

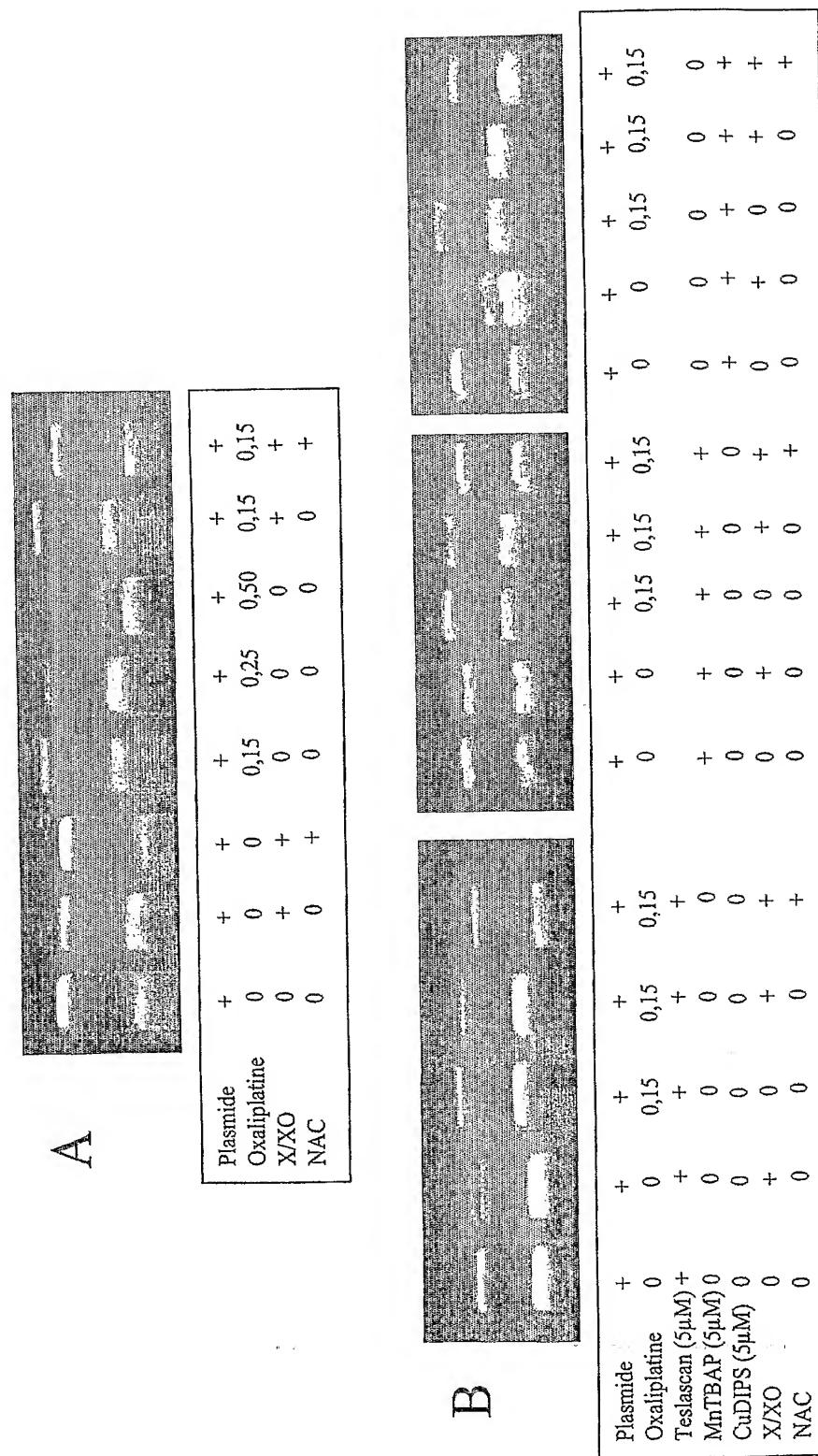


Figure 33

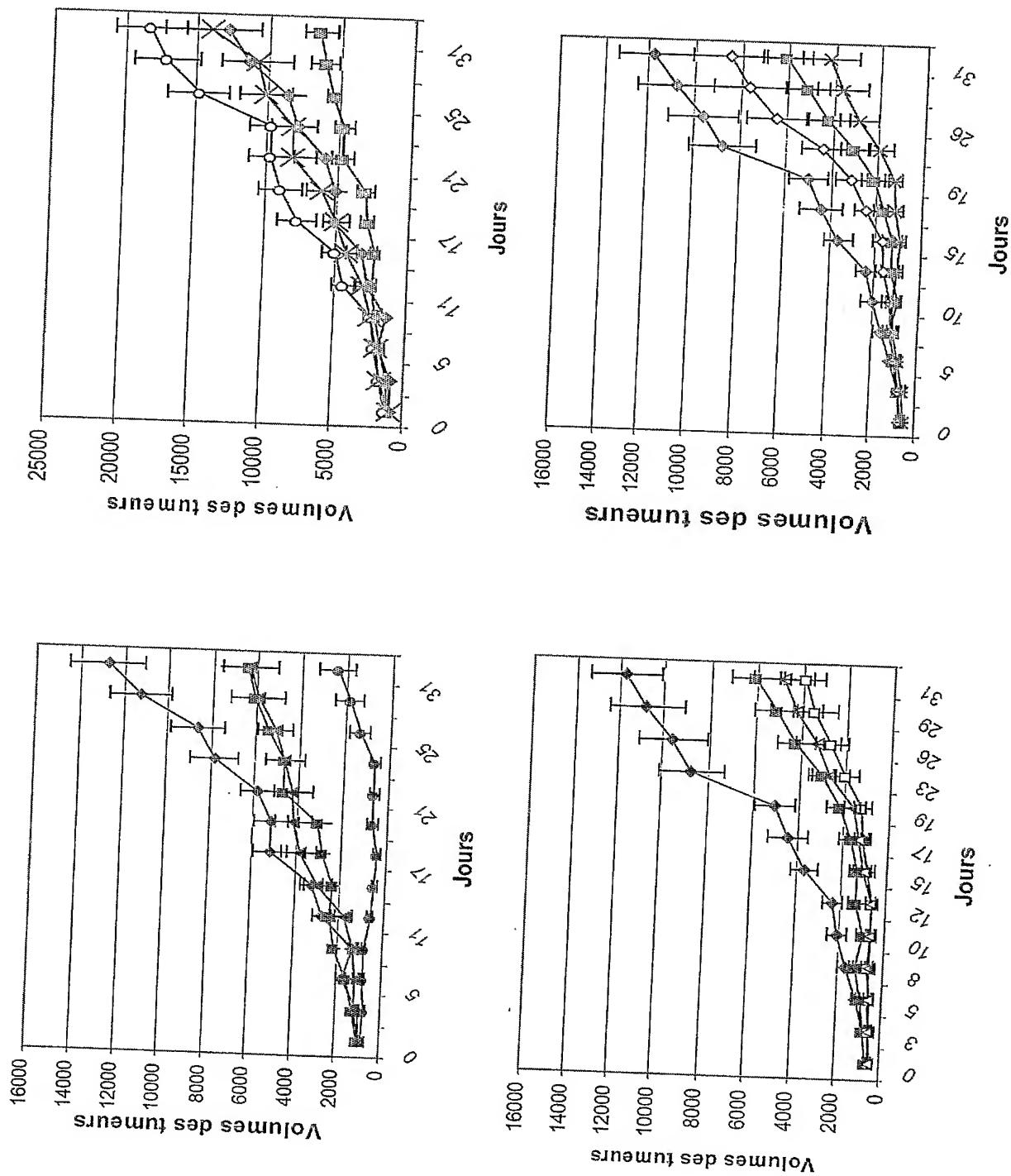


Figure 34

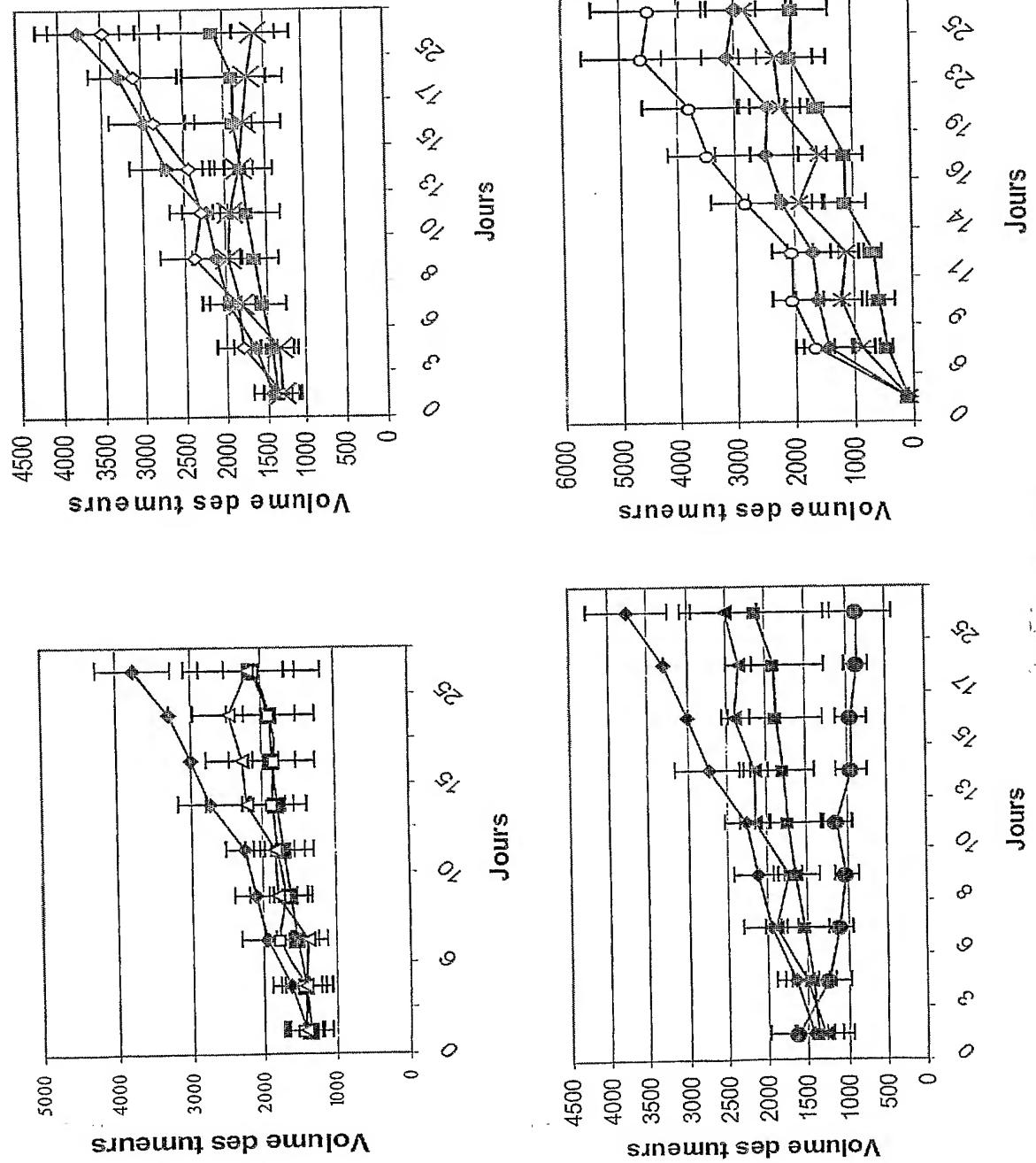


Figure 35



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

N° 11235*03


DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1.../1...

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 @ W / 270601

Vos références pour ce dossier (facultatif)		MJPbv1405/4FR																																																												
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		03 14933																																																												
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)																																																														
UTILISATION DE MIMETIQUES DE LA SUPEROOXYDE DISMUTASE ET DE LA GLUTATHION REDUCTASE COMME ANTI-CANCEREUX.																																																														
LE(S) DEMANDEUR(S) :																																																														
1 - UNIVERSITE RENE DESCARTES (PARIS V) 12, rue de l'Ecole de Médecine 75006 PARIS,																																																														
2 - PROTEXEL Faculté de Médecine Cochin Port-Royal, 24, rue du Faubourg Saint-Jacques 75014 PARIS																																																														
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :																																																														
<table border="1"> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>Nom</td> <td>WEILL</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Prénoms</td> <td>Bernard</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">Adresse</td> <td>Rue</td> <td>7 allée Mauchain</td> </tr> <tr> <td>Code postal et ville</td> <td>19 516 000 EAUBONNE</td> </tr> <tr> <td colspan="3">Société d'appartenance (facultatif)</td> </tr> <tr> <td colspan="3"> <table border="1"> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>Nom</td> <td>BATTEUX</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Prénoms</td> <td>Frédéric</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">Adresse</td> <td>Rue</td> <td>17, rue Desnouettes</td> </tr> <tr> <td>Code postal et ville</td> <td>17 500 15 PARIS</td> </tr> <tr> <td colspan="3">Société d'appartenance (facultatif)</td> </tr> <tr> <td colspan="3"> <table border="1"> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>Nom</td> <td>LAURENT</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Prénoms</td> <td>Alexis</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">Adresse</td> <td>Rue</td> <td>34, rue des Epinettes</td> </tr> <tr> <td>Code postal et ville</td> <td>19 441 00 SAINT-MAURICE</td> </tr> <tr> <td colspan="3">Société d'appartenance (facultatif)</td> </tr> </table> </td> </tr> </table> </td> </tr> <tr> <td colspan="3">S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.</td> </tr> <tr> <td colspan="3"> DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) </td> </tr> <tr> <td colspan="3"> </td> </tr> <tr> <td colspan="3"> VIALLE-PRESLES Marie José N° 93-2009 </td> </tr> </table>			<input checked="" type="checkbox"/>	Nom	WEILL	Prénoms		Bernard	Adresse	Rue	7 allée Mauchain	Code postal et ville	19 516 000 EAUBONNE	Société d'appartenance (facultatif)			<table border="1"> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>Nom</td> <td>BATTEUX</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Prénoms</td> <td>Frédéric</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">Adresse</td> <td>Rue</td> <td>17, rue Desnouettes</td> </tr> <tr> <td>Code postal et ville</td> <td>17 500 15 PARIS</td> </tr> <tr> <td colspan="3">Société d'appartenance (facultatif)</td> </tr> <tr> <td colspan="3"> <table border="1"> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>Nom</td> <td>LAURENT</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Prénoms</td> <td>Alexis</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">Adresse</td> <td>Rue</td> <td>34, rue des Epinettes</td> </tr> <tr> <td>Code postal et ville</td> <td>19 441 00 SAINT-MAURICE</td> </tr> <tr> <td colspan="3">Société d'appartenance (facultatif)</td> </tr> </table> </td> </tr> </table>			<input checked="" type="checkbox"/>	Nom	BATTEUX	Prénoms		Frédéric	Adresse	Rue	17, rue Desnouettes	Code postal et ville	17 500 15 PARIS	Société d'appartenance (facultatif)			<table border="1"> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>Nom</td> <td>LAURENT</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Prénoms</td> <td>Alexis</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">Adresse</td> <td>Rue</td> <td>34, rue des Epinettes</td> </tr> <tr> <td>Code postal et ville</td> <td>19 441 00 SAINT-MAURICE</td> </tr> <tr> <td colspan="3">Société d'appartenance (facultatif)</td> </tr> </table>			<input checked="" type="checkbox"/>	Nom	LAURENT	Prénoms		Alexis	Adresse	Rue	34, rue des Epinettes	Code postal et ville	19 441 00 SAINT-MAURICE	Société d'appartenance (facultatif)			S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.			DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)						VIALLE-PRESLES Marie José N° 93-2009		
<input checked="" type="checkbox"/>	Nom	WEILL																																																												
Prénoms		Bernard																																																												
Adresse	Rue	7 allée Mauchain																																																												
	Code postal et ville	19 516 000 EAUBONNE																																																												
Société d'appartenance (facultatif)																																																														
<table border="1"> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>Nom</td> <td>BATTEUX</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Prénoms</td> <td>Frédéric</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">Adresse</td> <td>Rue</td> <td>17, rue Desnouettes</td> </tr> <tr> <td>Code postal et ville</td> <td>17 500 15 PARIS</td> </tr> <tr> <td colspan="3">Société d'appartenance (facultatif)</td> </tr> <tr> <td colspan="3"> <table border="1"> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>Nom</td> <td>LAURENT</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Prénoms</td> <td>Alexis</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">Adresse</td> <td>Rue</td> <td>34, rue des Epinettes</td> </tr> <tr> <td>Code postal et ville</td> <td>19 441 00 SAINT-MAURICE</td> </tr> <tr> <td colspan="3">Société d'appartenance (facultatif)</td> </tr> </table> </td> </tr> </table>			<input checked="" type="checkbox"/>	Nom	BATTEUX	Prénoms		Frédéric	Adresse	Rue	17, rue Desnouettes	Code postal et ville	17 500 15 PARIS	Société d'appartenance (facultatif)			<table border="1"> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>Nom</td> <td>LAURENT</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Prénoms</td> <td>Alexis</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">Adresse</td> <td>Rue</td> <td>34, rue des Epinettes</td> </tr> <tr> <td>Code postal et ville</td> <td>19 441 00 SAINT-MAURICE</td> </tr> <tr> <td colspan="3">Société d'appartenance (facultatif)</td> </tr> </table>			<input checked="" type="checkbox"/>	Nom	LAURENT	Prénoms		Alexis	Adresse	Rue	34, rue des Epinettes	Code postal et ville	19 441 00 SAINT-MAURICE	Société d'appartenance (facultatif)																															
<input checked="" type="checkbox"/>	Nom	BATTEUX																																																												
Prénoms		Frédéric																																																												
Adresse	Rue	17, rue Desnouettes																																																												
	Code postal et ville	17 500 15 PARIS																																																												
Société d'appartenance (facultatif)																																																														
<table border="1"> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>Nom</td> <td>LAURENT</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Prénoms</td> <td>Alexis</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">Adresse</td> <td>Rue</td> <td>34, rue des Epinettes</td> </tr> <tr> <td>Code postal et ville</td> <td>19 441 00 SAINT-MAURICE</td> </tr> <tr> <td colspan="3">Société d'appartenance (facultatif)</td> </tr> </table>			<input checked="" type="checkbox"/>	Nom	LAURENT	Prénoms		Alexis	Adresse	Rue	34, rue des Epinettes	Code postal et ville	19 441 00 SAINT-MAURICE	Société d'appartenance (facultatif)																																																
<input checked="" type="checkbox"/>	Nom	LAURENT																																																												
Prénoms		Alexis																																																												
Adresse	Rue	34, rue des Epinettes																																																												
	Code postal et ville	19 441 00 SAINT-MAURICE																																																												
Société d'appartenance (facultatif)																																																														
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.																																																														
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)																																																														
VIALLE-PRESLES Marie José N° 93-2009																																																														